

**Fluoreszierende Pseudomonaden als Antagonisten
im System *Cucumis sativus* L./*Pythium ultimum* Trow:
Wirksamkeit, Wirkungssicherheit und
Einfluß von Flavonoiden**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps–Universität Marburg

vorgelegt von

Ulrike Maria Schulz

aus Stuttgart–Bad Cannstatt

Marburg/Lahn 1998

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am 11.09.1998.

Erstgutachter: Prof. Dr. D. Werner

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Senger

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.1998

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 Chemikalien	7
2.2 Rezepte der Kulturmedien und Lösungen	7
2.3 Versuchsorganismen	12
2.4 Erhaltungskulturen	13
2.5 Anzucht und Vermehrung der Bakterien	13
2.5.1 Zellkulturen in Erlenmeyerkolben	13
2.5.2 Zellkulturen im 2l-Fermenter	14
2.6 Physiologische Charakterisierung der fluoreszierenden Pseudomonaden	15
2.6.1 Charakterisierung der Pseudomonaden nach BIOLOG™	15
2.6.2 Dualkulturen der Pseudomonaden mit <i>Pythium ultimum</i> (Antibiose-Test)	16
2.7 Identifizierung des verwendeten <i>Pythium</i>-Isolates	16
2.7.1 Lichtmikroskopie	16
2.7.2 Genomanalyse	17
2.8 Besiedelungsstudien mit fluoreszierenden Pseudomonaden	19
2.8.1 Inokulation der Objekte mit Pseudomonaden	19
2.8.1.1 Tauchbehandlung von Samen und Keimlingswurzeln	19
2.8.1.2 Inkrustierung von Samen mit Gummi Arabicum	19
2.8.2 Rasterelektronenmikroskopie von behandelten Samen und Keimlingswurzeln	20
2.8.2.1 Herstellung der Präparate	20
2.8.2.2 Mikroskopierte Präparate	20
2.8.3 Rückisolierung der Pseudomonaden	21

2.9 Aufbau eines standardisierten Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystems	22
2.9.1 Standardisierung der Saatgutbehandlung	22
2.9.1.1 Festlegung der Sterilisierungstechnik	22
2.9.1.2 Saatgutbehandlung bei den Gewächshausversuchen	23
2.9.2 Überprüfung der Saatgutkeimfähigkeit von <i>Cucumis sativus</i>	24
2.9.3 Bestimmung und Festlegung der Wasserkapazität der Topferde	24
2.9.4 Festlegung der abiotischen Bedingungen	24
2.9.5. Entwicklung eines Verfahrens zur Erzeugung reproduzierbarer <i>Pythium</i> -Infektionen	25
2.9.5.1 Produktion des <i>Pythium</i> -Inokulums	25
2.9.5.2 Pflanzenanzucht und Bodeninokulation mit <i>Pythium</i>	25
2.9.5.3 Zeitspanne zwischen Bodeninokulation und Aussaat	26
2.9.5.4 Nachweis von <i>Pythium</i> im Boden	26
2.10 Quantifizierung des antagonistischen Potentials verschiedener Pseudomonaden gegenüber <i>Pythium ultimum</i> im Gewächshaus-Testsystem	27
2.10.1 Pflanzenanzucht	27
2.10.2 Bestimmung der Auflaufraten und Wachstumsparameter	27
2.10.3 Statistische Auswertung	27
2.11 Gewinnung phenolischer Substanzen aus den Wurzelexsudaten von Gurkenkeimlingen	28
2.11.1 Kultivierung der Pflanzen	28
2.11.2 Extraktion phenolischer Substanzen aus Cellulose-Acetat-Filtern	30
2.11.3 Verfahren zur Analyse des Wurzelexsudates	30
2.11.3.1 HPTLC / UV-Spektroskopie	30
2.11.3.2 HPLC / UV-Spektroskopie	32
2.12 Einsatz von Flavonoiden im System <i>Cucumis sativus</i> / <i>Pythium ultimum</i> / <i>Pseudomonas fluorescens</i> W34	33
3 ERGEBNISSE	35
3.1 Charakterisierung der fluoreszierenden Pseudomonaden	35
3.1.1 Muster der C-Quellen-Verwertung nach BIOLOG TM	35
3.1.2 Hemmwirkung der Pseudomonaden in Dualkulturen mit <i>Pythium ultimum</i>	38
3.2 Determination des <i>Pythium</i>-Isolates	41
3.2.1 Lichtmikroskopisch bestimmbare Charakteristika	41

3.2.2 RFLPs (Restriktionfragmentlängenpolymorphismen)	43
3.3 Besiedelung von Gurkensamen und -keimlingswurzeln durch fluoreszierende Pseudomonaden	44
3.3.1 Besiedelung der Samen nach Tauchbehandlung	45
3.3.1.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	45
3.3.1.2 Rückisolierung der Pseudomonaden von Samenoberflächen	47
3.3.2 Besiedelung der Keimlingswurzeln nach Tauchbehandlung	47
3.3.2.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	48
3.3.2.2 Einfluß der Inokulumdichte auf die Besiedelungsstärke von <i>P. fluorescens</i> W34	49
3.3.2.3 Rückisolierung der Pseudomonaden von Wurzeloberflächen	50
3.3.3 Besiedelung der Keimlingswurzeln nach Samenbehandlung	50
3.3.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	51
3.3.3.2 Rückisolierung der Pseudomonaden von Keimlingswurzeln nach Samenbehandlung	52
3.4 Etablierung eines standardisierten Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystems	53
3.4.1 Effektivität der Samenbehandlung	53
3.4.1.1 Beurteilung der Samensterilisation	53
3.4.1.2 Effektivität der Saatgutinkrustierung mit Pseudomonaden	54
3.4.2 Saatgutkeimfähigkeit von <i>Cucumis sativus</i> L.	56
3.4.3 <i>Pythium</i> -Infektionstests zur Erzeugung reproduzierbarer Infektionen	57
3.4.3.1 Einfluß der <i>Pythium</i> -Inokulummenge und der Zeitspanne zwischen Bodeninokulation und Aussaat auf den Befall von <i>Cucumis sativus</i> L.	57
3.4.3.2 Inokulumdichten von <i>Pythium ultimum</i> nach künstlicher Bodeninokulation	61
3.5 Anwendung des Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystems zur Bestimmung der antagonistischen Wirksamkeit fluoreszierender Pseudomonaden gegen <i>Pythium ultimum</i>	61
3.5.1 Auflaufraten und Wachstumsparameter der Kontrollen	62
3.5.2 Einfluß von Saatgutbehandlungen mit Pseudomonaden auf den Befall von - Gurken mit <i>Pythium ultimum</i>	63
3.5.3 Einfluß von Saatgutbehandlungen mit Pseudomonaden auf die Wachstumsparameter von Gurken	65
3.5.4 Einfluß von Flavonoidzugaben auf die Wirksamkeit von <i>Pseudomonas fluorescens</i> W34	66
3.6 Analyse phenolischer Substanzen aus dem Wurzelexsudat von <i>Cucumis sativus</i> L.	71

3.6.1 HPTLC-Analyse	71
3.6.2 HPLC-Analyse	73
3.7 Einfluß von Luteolin-7-Glucosid auf das Wachstum <i>Pseudomonas fluorescens</i> W34	79
4 DISKUSSION	81
4.1 Entwicklung von Pflanzen-Pathogen-Testsystemen und Einsatz von Antagonisten <i>ad planta</i>	81
4.1.1 Die Erzeugung reproduzierbarer Infektionen	81
4.1.2 Das Einbringen von Antagonisten	83
4.1.3 Aussagekraft des Testsystems	84
4.2 Antagonistische Wirksamkeit fluoreszierender Pseudomonaden gegen <i>P. ultimum</i> und Verbesserung der Wirkungssicherheit durch Flavonoide	86
4.2.1 Das antagonistische Potential der Pseudomonaden	86
4.2.2 Flavonoide als Wirksubstanzen im Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystem	89
4.3 Interaktionen zwischen <i>Pythium ultimum</i>, den Pseudomonaden und <i>Cucumis sativus</i>	91
4.3.1 Das Besiedelungsvermögen der Pseudomonaden	91
4.3.2 Die Bedeutung der Wurzelexsudate	94
5 ZUSAMMENFASSUNG	97
6 LITERATURVERZEICHNIS	100
7 ANHANG	112
Definition der verwendeten Abkürzungen	112
Publikationen und Tagungsbeiträge	113
Erklärung	114
Danksagung	115

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung der Wirksamkeit fluoreszierender Pseudomonaden als biologische Mittel gegen den bodenbürtigen phytopathogenen Pilz *Pythium ultimum*, einem der Hauptverursacher der Keimlingsumfallkrankheit im Unterglasanbau von Gurken (*Cucumis sativus* L.), deren Befall zu erheblichen Ernteverlusten führen kann.

Pythium ultimum gehört zu den Oomyceten, einer Pilzklasse, die für die phytopathologische Forschung hochinteressant ist, da eine Reihe wirtschaftlich sehr bedeutender Erreger von Pflanzenkrankheiten zu ihr zählen (Schlösser 1983). Die Oomyceten nehmen unter den Pilzen aber auch deshalb eine herausragende Stellung ein, weil sie einige für Pilze ungewöhnliche Charakteristika aufweisen. Eine Besonderheit ist die cellulose- und hemicellulosehaltige, aber chitinlose Zellwand (Bartnicki-Garcia 1968). Eine Reihe weiterer Auffälligkeiten, die anhand biochemischer, struktureller und genetischer Analysen (Gunderson et al. 1987, Förster et al. 1990, Preisig 1989) entdeckt wurden, weisen daraufhin, daß die Oomyceten den heterokonten Algen, speziell den Xanthophyceen phylogenetisch am nächsten stehen (Barr 1992).

Van der Plaats-Niterink (1981) beschreibt 87 anerkannte *Pythium*-Arten, zusätzliche Veröffentlichungen erhöhen diese Zahl auf über 120 (Dick, 1990). Die Art *Pythium ultimum* hat ein außerordentlich breites Wirtsspektrum und ist weltweit verbreitet. Durch die Ausbildung langlebiger Oosporen oder als Myzel in nach Infektion abgestorbenem Pflanzenmaterial kann *Pythium* mehrere Jahre im Boden überleben und tritt deshalb im Freiland fruchtfolgeunabhängig auf.

Die durch *Pythium* hervorgerufenen typischen Symptome – Einschnürungen am Hypokotyl und plötzliches Umknicken von gesundaussehenden Keimlingen (Abb.1) – haben den Namen Umfallkrankheit geprägt, aber auch Chlorosen und ein reduziertes, farbloses und faulendes Wurzelsystem werden im allgemeinen als Symptome beobachtet. Häufig werden zur Beschreibung des Absterbens befallener Keimlinge die Begriffe „Damping-off“ und „Post-Emergence-Damping-off“ verwendet. Hinter ihnen können sich allerdings auch eine Reihe von Krankheiten verbergen, die durch andere boden- und samenbürtige Pathogene hervorgerufen werden. Typische Erreger von „Damping-off“ bei Cucurbitaceen sind neben *Pythium* spp. beispielsweise *Acremonium* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn und *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris (Martyn et al. 1993). Der Ausbruch der Krankheit wird sowohl bei *Pythium*-, als auch bei *Phytophthora*-Arten durch hohe Bodenfeuchtigkeit und niedrige Temperaturen gefördert, bei *Rhizoctonia*- und *Fusarium*-Arten dagegen durch wärmere und trockenere Bedingungen.

Oft ist das weiße Myzel von *Pythium* auf dem oberirdischen Gewebe der befallenen Pflanzen und zwischen den Bodenpartikeln zu erkennen. *Pythium* kann aber auch schon Samen befallen, wenn bei der Keimung Feuchtigkeit in die Samenschale eindringt oder wenn sich die Keimlingswurzel entwickelt. Dann setzt Fäule noch unterhalb der Bodenoberfläche ein („Pre-Emergence-Damping-off“). Diese Art von Befall resultiert in dürrtigen, ungleichen Keimlingsbeständen, was allerdings leicht mit einer niedrigen Samenkeimfähigkeit verwechselt werden kann.



Abb. 1. Gurkenkeimlinge nach Anzucht in mit *Pythium ultimum* inokulierter Erde. Ein Keimling zeigt das typische Krankheitssymptom des Umknickens.

Eine Infektion mit *Pythium ultimum* kann nach Kontakt von Zoosporen mit dem Oberflächengewebe der Wirtspflanzen erfolgen. Die Zoosporen werfen ihre Geißeln ab und bilden eine kugelförmige Zyste, die sich an die Pflanzenzellwand heftet und diese mit einer von einem Appressorium ausgehenden Infektionshyph durchbohrt (Agrios 1988, Schlösser 1983). Auch Oosporen und saprophytisches Myzel können durch die Bildung solcher Penetrationshyphen infektiös sein. Durch mechanischen Druck und mit Hilfe von pektinolytischen und cellulolytischen Enzymen tötet der Pilz das Wirtsgewebe ab, ernährt sich davon (perthotrophe Ernährung) und vermehrt sich intrazellulär. Enzyme für den Abbau von Zellwandinkrustationsmaterialien wie Lignin und Suberin sind nicht am Infektionsprozeß beteiligt, weshalb der Pilz in Keimlingswurzeln, unabhängig vom Alter der Pflanze aber vor allem auch in die für die Aufnahme von Nährstoffen und Wasser essentiellen Wurzelspitzen eintritt und diese abtötet.

Da eine Bekämpfung von *Pythium* nach dem Befall sehr schwierig ist, werden oft prophylaktische Methoden angewendet. Zu diesen zählt beispielsweise eine geeignete Bodenvorbereitung und die Einhaltung bestimmter Kultivierungsbedingungen, die eine möglichst kurze Keimungsphase und somit ein schnelles Auflaufen der Pflanzen fördern, d.h. der Boden sollte gut drainiert und belüftet sein und einen geeigneten pH-Wert besitzen.

Außerdem sind adäquate Pflanztiefen zu wählen und auch bei Düngergaben sollte auf geeignete Mengen geachtet werden. Herkömmlich ist auch die Verwendung von fungizid-behandeltem Saatgut mit hoher Keimungsrate. In Deutschland sind zur Zeit zwei chemische Mittel („Aatiram“ und „TMTD 98% Satec“) mit dem Wirkstoff Thiram zur Beizung von Gurkensaatgut zugelassen¹. Zur Prophylaxe muß auch auf die Einhaltung geeigneter Abstandsverhältnisse beim Einsäen geachtet werden, um zu dichte Pflanzenbestände, zu geringe Durchlüftung und niedrige Lichtintensitäten zu vermeiden. Gründüngergaben vor dem Aussäen sollten vermieden werden. Für den Gewächshausanbau gilt allgemein auch die Einhaltung strenger Hygienemaßnahmen.

Für eine chemische Bodenbehandlung zur Reduzierung des *Pythium*-Inokulums nach dem Befall oder bei Infektionsgefahr ist in Deutschland zur Zeit kein Mittel gegen *Pythium* für den Einsatz im Untergrasanbau von Gemüse zugelassen. Im Untergrasanbau von Zierpflanzen werden allerdings Präparate mit dem systemisch wirkenden Fungizid Metalaxyl („Fongamil Neu“) und Propamocarb („Previcur N“) eingesetzt. In den USA werden gegen *Pythium* auch Metalaxyl-Produkte bei Gemüsepflanzen eingesetzt (Lancaster 1997), wenn Damping-off in einem Bestand ausgebrochen ist. Die Verwendung chemischer Mittel ist jedoch umwelt-toxikologisch bedenklich, und der Zeitraum, über den sie im Wurzelbereich der Pflanzen in einer für eine gute Wirksamkeit ausreichenden Konzentration vorhanden sind, begrenzt. Immer wieder wird auch über Metalaxylresistenzen pflanzenpathogener Oomyceten berichtet².

Aus diesen Gründen bieten biologische Mittel, insbesondere Mikroorganismen, für den Einsatz gegen bodenbürtige Schädlinge viele Möglichkeiten (Becker und Schwinn, 1993). Obwohl die ersten Versuche zur direkten Nutzung von antagonistischen Mikroorganismen zur Kontrolle von Pflanzenkrankheiten bereits vor über 70 Jahren gemacht wurden (Cook and Baker 1983, Baker 1987), hat der biologische Pflanzenschutz erst nach Entdeckung und Beschreibung suppressiver Böden (Schneider 1982, Cook and Baker 1983, Hornby 1983, Alabouvette 1990) größere Beachtung gefunden, in denen durch eine natürlich vorhandene Mikroflora die Schadwirkung von bodenbürtigen Phytopathogenen unterdrückt wird (Schroth und Hancock 1982).

Mit der biologischen Bekämpfung von *Pythium*-Arten als ubiquitäre Erreger von Keimlingskrankheiten (Hendrix und Campbell 1973; Stanghellini 1974) beschäftigten sich in neuerer Zeit zahlreiche Arbeiten (Harman und Hadar 1983), wobei beispielsweise neben Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Enterobacter* und *Erwinia* (Hwang et al. 1996, Nelson 1988, Hadar et al. 1983, Howell et al. 1988, Vandijk et al. 1998) auch Pilze der Gattungen *Chaetomium*, *Trichoderma* und *Gliocladium* (Howell 1991, Di Pietro 1992, Lifshitz et al. 1986, Harman et al. 1980, Chet et al. 1981, Lumsden et al. 1990, Lynch et al. 1991) als Antagonisten eingesetzt wurden. Auch mykoparasitische *Pythium*-Arten (*Pythium oligandrum* und *Pythium nunn*) wurden gegen *Pythium ultimum*-Befall verwendet (Martin und Hancock 1987, Paulitz und Baker 1987). Da vor allem die Fähigkeit, sich in der Rhizosphäre der Pflanzen etablieren zu können eine große Rolle für die langfristige Wirksamkeit von Antagonisten im Boden spielt (Schippers et al. 1987, Weller 1988), wird zunehmend der Gruppe der fluoreszierenden

¹ Quelle: BBA für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig (Hrsg.): Pflanzenschutzmittelverzeichnis 1998, 46. Aufl.

² Quellen: 19th Fungal Genetics Conference Information (Internet:<http://kumchttp.mc.ukans.edu/research/fgsc/asilomar/oomycete.html>); Internet: <http://www.esf.edu/faculty/efb/facpage/dhg/mycologia/89-2ABS.-HTM#291>.

Pseudomonaden (Howell und Stipanovic 1980, Weller, 1988, Keel et al. 1990, O'Sullivan und O'Gara 1992, De Leij und Lynch 1997) als typischen Bakterien der Rhizosphäre ein besonders hohes antagonistisches Potential in der Bekämpfung bodenbürtiger Phytopathogene zugeschrieben. Ihr Anteil an der Rhizosphärenpopulation liegt bei bis zu 10% (Rovira 1985, Elsherif und Grossmann 1990). Speziell über die Anwendung fluoreszierender Pseudomonaden als Antagonisten gegen *Pythium ultimum* liegt eine Vielzahl von Veröffentlichungen vor (Howell und Stipanovic 1980, Yuen et al. 1987, Becker und Cook 1988, Loper 1988, Kraus und Loper 1991, Koch 1997, Vogt et al. 1997, Arndt et al. 1998).

Einige spezielle Eigenschaften dieser Bakteriengruppe werden für ihre nützlichen Wirkungen verantwortlich gemacht, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Produktion von Antibiotika (Fravel 1988, Keel et al. 1990, Thomashow und Mavrodi 1997), Siderophoren und Cyaniden (Becker und Cook 1988, Loper 1988). Ihre Fähigkeit zur Nutzung vielseitiger Nährstoffe (O'Sullivan und O'Gara 1992, Handelsman und Staab 1996) und zur aggressiven Wurzelbesiedelung (Scher et al. 1988) ermöglicht es ihnen, sich in der Pflanzenrhizosphäre zu vermehren und auszubreiten und die endemische Mikroflora zu verdrängen (Suslow et al. 1979). Sie können deshalb über einen sehr viel längeren Zeitraum als chemische Mittel vor bodenbürtigen Pathogenen schützen. In jüngerer Zeit werden fluoreszierenden Pseudomonaden auch resistenzinduzierende Fähigkeiten zugeschrieben (Défago et al. 1990, Wei et al. 1996).

Die Anwendung fluoreszierender Pseudomonaden bei der biologischen Bekämpfung von bodenbürtigen Phytopathogenen wie *Pythium ultimum* erfolgte bisher an den unterschiedlichsten Gemüsearten, sowohl im Freiland als auch in Gewächshauskulturen (Kaiser et al. 1989, Paulitz und Loper 1991, Cruz et al. 1992, Zhou und Paulitz 1993, Rankin und Paulitz 1994).

Im allgemeinen wird die Wirkung von biologischen Mitteln und auch die Aktivität pathogener Bodenpilze stark beeinflusst durch abiotische Faktoren wie Bodenzusammensetzung, Bodenfeuchtigkeit, pH-Wert und Temperatur des Bodens (Stanghellini und Burr 1973, Davies und Whitbread 1989, Fukui et al. 1994), so daß die Arbeiten zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten mit Mikroorganismen bisher nur selten zur Entwicklung praxisreifer Bekämpfungsverfahren führten. In Deutschland wurde vor kurzem allerdings erstmals ein Präparat auf Antagonistenbasis („Contans“) zugelassen, das den pilzlichen Mykoparasiten *Coniothyrium minitans* enthält, der im Boden natürlich verbreitet ist und gegen bodenbürtige pilzliche Pathogene an Kopfsalat eingesetzt wird³, wobei eine Erweiterung auf andere Kulturen wie Gurken und Bohnen angestrebt wird. Seit einiger Zeit ist auch das holländische Produkt TRI002/003, welches *Trichoderma harzianum* als Wirkstoff enthält, im Gurkenanbau zugelassen⁴, wobei vor allem die Enzym- und Hormonproduktion des Pilzes in der Rhizosphäre als entscheidend für den geringeren Befall der Pflanzen angegeben wird.

In den meisten Fällen erfolgt jedoch keine Umsetzung von Forschungsergebnissen in praxisreife Präparate und Verfahren, was einerseits – wie schon erwähnt – auf eine oft zu geringe Wirkungssicherheit zurückzuführen ist, andererseits sind die Produkte nur in speziellen Systemen wirksam und weisen somit also ein relativ geringes Marktpotential auf. Nicht zuletzt spielen auch die im Vergleich zur Profitabilität hohen Registrierungskosten eine Rolle bei der Umsetzung solcher Produkte in die Praxis (Whipps und McQuilken 1993, Törmälä 1995).

³ Quelle (Internet): http://www.bba.de/mitteil/topakt/feb98_1.ht

⁴ Mündl. Mitteilung Dr. E. Koch, BBA Darmstadt

Um eine genügend hohe Wirkungssicherheit für eine zukünftige Anwendbarkeit von biologischen Mitteln bei der Bekämpfung bodenbürtiger Pathogene in der Praxis zu erreichen, müssen einerseits in geeigneten, praxisnahen Pflanzentestsystemen verstärkt zuverlässige Qualitätsbeurteilungen vorgenommen werden, und andererseits die Erforschung der Wirkungsmechanismen verstärkt werden. Nur wenn man diese genau kennt, können zusätzliche Maßnahmen zur Erhöhung der Wirkungssicherheit ergriffen werden.

Da sich Interaktionen zwischen Pflanze, bodenbürtigem Pathogen und Antagonist im durchwurzelten Bodenraum abspielen, ist in erster Linie die Rhizosphäre von besonderem Interesse. Sie bietet Bodenmikroorganismen, vor allem aufgrund ihres Nährstoffreichtums gute Lebensbedingungen (Lynch 1990, Curl und Truelove 1986). Bis zu 40% ihrer Kohlenstoff-Assimilate können Pflanzen über die Wurzeln in Form von beispielsweise Zuckern, Aminosäuren, organischen Säuren, Fettsäuren, Nukleotiden, Vitaminen, Enzymen und Flavonoiden in die Rhizosphäre ausscheiden (Lynch und Whipps 1990). Die Wurzel-exsudatinhaltsstoffe können den Bodenmikroorganismen aber nicht nur als Nährstoffe dienen, sondern auch die spezifische Zusammensetzung der Rhizosphärenflora beeinflussen. So wurde beispielsweise den Flavonoiden die Fähigkeit nachgewiesen, die Aktivitäten von Bodenmikroorganismen im mikro- und nanomolaren Konzentrationsbereich zu regulieren. Einige induzieren beispielsweise die Transkription der Nodulationsgene bei *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* und *Bradyrhizobium* in der Symbiose mit Leguminosen, bei anderen Organismen der Rhizosphäre bewirken sie chemotaktisches Verhalten und beeinflussen die Wachstumsraten von Bakterien und Pilzen, darunter auch *Pythium ultimum* (Stanghellini und Hancock 1971, Nelson 1990, Hartwig et al. 1991, Phillips und Tsai 1992, Werner 1992, Gamliel und Katan 1992a,b, Scher et al. 1985). Neben Rhizobien sind außerdem auch Pseudomonaden und Pilze in der Lage, bestimmte Flavonoide aufzunehmen (Hubac et al. 1993, Schulz et al. 1972).

Aufgrund ihrer bisher bekannten vielfältigen Wirkungen in der Rhizosphäre und den dafür erforderlichen ausgesprochen niedrigen Konzentrationen sind Flavonoide eine für den Einsatz als Supplemente in der biologischen Bekämpfung von bodenbürtigen Erregern hochinteressante Substanzklasse.

Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte das antagonistische Potential verschiedener fluoreszierender Pseudomonaden gegenüber dem Pathogen *Pythium ultimum* unter praxisnahen Bedingungen in einem Pflanzentest untersucht werden. Nach Verifizierung der Identität des für diese Arbeit zur Verfügung stehenden *Pythium*-Isolates sollte deshalb zur Prüfung der Wirksamkeit der Pseudomonaden *ad planta* ein standardisiertes, aussagekräftiges Pflanzen-Pathogen-Testsystem für Unterglas-Kulturen von Gurken entwickelt und etabliert werden. Dabei war die Erzeugung reproduzierbarer Infektionen und die Optimierung der Saatgutbehandlung ein Hauptziel.

Als eine Möglichkeit, das befallsmindernde Potential von Bakterien zu stärken, und somit deren Wirkungssicherheit im Hinblick auf eine Anwendung in der Praxis zu erhöhen, sollte die Wirkung ausgewählter Flavonoide als Bodensupplemente in mikromolaren

Konzentrationen im etablierten Pflanzen-Testsystem in Kombination mit der Anwendung eines der *Pseudomonas*-Isolate untersucht werden.

Ein weiteres wichtiges Ziel der Arbeit war die Aufklärung möglicher Wirkungsmechanismen unter Laborbedingungen. Hierzu sollte zunächst eine stammspezifische physiologische Charakterisierung der *Pseudomonas*-Stämme mit Hilfe eines Bakterienidentifikationssystems (BIOLOG™) vorgenommen werden. Durch Besiedelungsstudien an Samen und Keimlingswurzeln der Gurken nach unterschiedlicher Applikation der Pseudomonaden sollte versucht werden, Hinweise darauf zu erhalten, ob sich die verwendeten Pseudomonaden in der Rhizosphäre etablieren können. Andererseits sollte in klassischen Dualkultur-Experimenten das antibiotische Potential der Pseudomonaden gegenüber dem Pathogen untersucht werden.

Um zu überprüfen, ob Flavonoide in mikromolaren Konzentrationen das Wachstum von Pseudomonaden direkt beeinflussen, sind *in vitro*-Studien an Fermenterkulturen aufgrund der Standardisierbarkeit der Anzuchtbedingungen und der Möglichkeit einer automatisierten Prozeßkontrolle ideal und sollten deshalb am Beispiel von Luteolin-7-Glucosid und eines der *Pseudomonas*-Isolate durchgeführt werden, wobei das Fermenter-System vor dieser Untersuchung aufzubauen und eine Standardisierung der Anzuchtbedingungen für Pseudomonaden vorzunehmen war.

Schließlich sollte im Rahmen dieser Arbeit auch das Wurzelexsudat der Testpflanze Gurke näher untersucht werden – beispielsweise auf flavonoidähnliche Inhaltsstoffe – um Hinweise auf deren mögliche Bedeutung bei den Wechselwirkungen zwischen Pflanze, Pathogen und antagonistischen Bakterien zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Lösungsmittel und Medienzusätze stammten, wenn keine anderen Bezugsquellen im Text angegeben sind, von der Firma Merck (Darmstadt). Methanol wurde von Baker (Deventer, Holland) bezogen, Luteolin-7-Glucosid stammte von der Firma Roth (Karlsruhe). Die anderen Flavonoid-Standardsubstanzen stammten von Apin Chemicals (Abingdon, England). Die Herkunft aller anderer Substanzen ist im Text vermerkt.

2.2 Rezepte der Kulturmedien und Lösungen

Die folgenden Nährmedien wurden mit aqua demin. auf das jeweils angegebene Volumen aufgefüllt und 20min bei 121°C und 2bar autoklaviert, einige empfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert.

King`s B Medium

(nach King et al. 1954)

pH 6,5

Pro 1000ml aqua demin.:

20g	Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Roth, Karlsruhe)
1,8g	K ₂ HPO ₄
1,5g	MgSO ₄ ×7H ₂ O
10ml	Glycerin

King`s B Agar (KBA)

pH 6,5

Pro 1000ml aqua demin.:

33,5g	Fertigmedium King`s B Agar
10ml	Glycerin

TY-Agar

pH 7,0

Pro 1000ml aqua demin.:

5,0g	Trypton
3,0g	Hefeextrakt
0,4g	CaCl ₂ ×2H ₂ O
15g	Agar

NB-Agar

pH 7,0

Pro 1000ml aqua demin.:

5,0g	Pepton
3,0 g	Fleischextrakt
15g	Agar

Tryptic Soy Agar (TSA)

pH 6,5

Pro 1000ml aqua demin.:

17,0g	Tryptose
3,0g	Pepton aus Sojamehl
5,0g	NaCl
2,5g	K ₂ HPO ₄
2,5g	Glucose
15g	Agar

Potato Dextrose Agar (PDA)

pH 6,5

Pro 1000ml aqua demin.:

24,0g	Potato Dextrose Broth
10g	Agar

M9-Mineral-Medium/Agar

pH 7,0

Pro 987ml aqua demin.:

6,0g	Na ₂ HPO ₄
3,0g	KH ₂ PO ₄
1,0g	NH ₄ Cl
0,5g	NaCl

Alle Komponenten wurden im angegeben Wasservolumen gelöst. Nach der Einstellung des pH-Wertes und nach dem Autoklavieren dieser Lösung wurden folgende einzeln autoklavierte bzw. sterilfiltrierte (*) Lösungen hinzugegeben:

10,0ml	Glucose-Lösung (20,0g D-Glucose pro 100ml)
1,0ml	MgSO ₄ × 7H ₂ O-Lösung (24,65g pro 100ml)
1,0ml	Thiamin HCl-Lösung * (10,0mg pro 10ml)
1,0ml	CaCl ₂ -Lösung (1,47g pro 100ml)

Zur Herstellung von M9-Agar wurde zur Hauptlösung 15g Agar zugegeben.

Möhrensaft- Agar (MÖS)

(nach Vogt 1994)

pH 6,5

Pro 1000ml aqua demin.:

60ml	Möhrensaft
25g	Agar

Maisgrieß-Sand-Medium (CMS)

(nach Kaiser und Hannan 1983)

Pro 300ml-Erlenmeyerkolben:

50g	gesiebter Sand (Korngröße <500µm)
1,5g	Maisgrieß
10ml	H ₂ O

Erdröhrchen-Medium

Es wurde eine Erdmischung aus Lehm, Sand und Komposterde (Volumverhältnis 1:1:2) hergestellt, mit welcher Reagenzgläser zu zwei Dritteln gefüllt wurden. Das Erds substrat wurde mit 2ml Leitungswasser angefeuchtet. Nach einem Tag wurden die Reagenzgläser verschlossen und anschließend an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 30min autoklaviert.

Maisbrühe-Öl-Medium (MBÖ)

pH 5,5

500ml Brühe von zerkleinerten, 1h gekochten und anschließend abgesiebten Maiskörnern (25g) wurde 20min bei 4000×g zentrifugiert und mit Leitungswasser auf 1l aufgefüllt. Pro 1000ml Medium wurde 1ml Weizenkeimöl zugegeben.

Oomyceten-Agar (SHA) (nach Schmitthenner 1962)

pH 5,5

Pro 1000ml aqua bidest:

11,6mg	Titriplex III*
410mg	Saccharose*
120mg	L-Asparagin*
30mg	KH ₂ PO ₄
30mg	K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O
20mg	MgSO ₄ ×7H ₂ O
80mg	CaCl ₂ ×2H ₂ O
0,04mg	Thiamin HCl*
2ml	Mikronährstofflösung
20g	Agar

Mikronährstofflösung:

440mg	ZnSO ₄ ×7H ₂ O
100mg	FeSO ₄ ×7H ₂ O
7mg	MnCl ₂ ×4H ₂ O
100ml	aqua bidest.

Die mit * markierten Substanzen wurden sterilfiltriert zu dem sterilisierten, abgekühlten Medium gegeben.

Selektiv-Agar zum Nachweis von *Pythium* spp. (SA-PBNC) (nach Schmitthenner 1979)

pH 5,5

1000ml SHA

Zusätze:

20mg	Pentachloronitrobenzen, gelöst in 0,5ml Aceton
40mg	Benomyl, gelöst in 5ml Ethanol (96%ig)
100mg	Neomycinsulfat, gelöst in 2ml aqua bidest.
10mg	Chloramphenicol, gelöst in 2ml aqua bidest.
10mg	Cholesterol, gelöst in 2ml N,N-dimethylformamid

Die Zusätze wurden sterilfiltriert ins abgekühlte Medium gegeben.

Hoagland-Gelrite

pH 6,5

Pro 1000ml aqua demin.:

123,25mg	MgSO ₄ ×7H ₂ O
57,54mg	NH ₄ H ₂ PO ₄
118,8mg	Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O
50,5mg	KNO ₃
7,5g	Gelrite

Spurenelemente:

0,527mg	H ₂ BO ₃
1,890mg	KCL
0,177mg	MnSO ₄ ×H ₂ O
0,290mg	ZnSO ₄ ×7H ₂ O
0,060mg	CuSO ₄ ×5H ₂ O
0,060mg	Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O

Fe-EDTA:

3,72mg	Titriplex III
2,75mg	FeSO ₄ ×7H ₂ O

Wasser-Agar

Pro 1000ml aqua demin.:

15,0g Agar

MES-Puffer

pH 6,2

Pro 1000ml aqua demin.:

0,976g Morpholinoethansulfonsäure (MES) (Serva, Heidelberg)

1,47g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Fixans für die Elektronenmikroskopie

Pro 312,5ml aqua demin.:

25ml Glutaraldehyd (25%) (Serva, Heidelberg)

156,25ml Cacodylatpuffer (0,2M)

Safranin-Lösung für die Lichtmikroskopie

Pro 100ml aqua demin.:

10ml Safranin O (0,5%) (Chroma, Stuttgart)

5ml Glycerin (87%)

10ml KOH (3%)

2.3 Versuchsorganismen

Das Saatgut der in dieser Arbeit verwendeten Gurken (*Cucumis sativus* L.) der Sorte „Delikateß“ wurde von der Firma Weigelt & Co (Walluf/Rheingau) bezogen.

Die *Pseudomonas fluorescens*-Isolate W5, W24 und W34 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. H. Buchenauer (Universität Hohenheim) zur Verfügung gestellt. Aus Untersuchungen von Vogt (1994) war bekannt, daß die Stämme W24 und W34 sowohl Cyanid als auch Siderophoren bilden können. Alle drei Stämme können keine Chitinasen und Cellulasen bilden.

Müller (1995) untersuchte das Wachstum der Stämme und zeigte, daß in Abhängigkeit vom Medium der Stamm W5 wesentlich längere Generationszeiten hat ($g = 1,4-3,3$) als die Stämme W24 ($g = 0,8-1,0$) und W34 ($g = 0,8-1,3$). Zu Beginn dieser Arbeit lagen erste Hinweise über antagonistische Fähigkeiten der Stämme W24 und W34 gegenüber *Pythium* sp. in Erdkulturen von Gurken vor (Vogt 1994), weshalb sich eine Reihe von Untersuchungen in dieser Arbeit vor allem auf diese drei Isolate konzentrieren.

Als Referenz-Stämme wurden die Bakterienisolate *Pseudomonas putida* I 112 und *Pseudomonas chlororaphis* II 232 von Dr. E. Koch (BBA Darmstadt) verwendet. Bei beiden Stämmen kann in Gewächshauskulturen von Gurken Antagonismus gegen *Pythium ultimum* nachgewiesen werden⁵. In das in dieser Arbeit zu etablierende Gewächshaus-Testsystem wurden die beiden Isolate deshalb nur als Referenz-Stämme integriert, außerdem wurden sie bei einigen Besiedelungsstudien mituntersucht.

Das in der Arbeit verwendete *Pythium*-Isolat wurde ebenfalls von Prof. Dr. H. Buchenauer (Universität Hohenheim) zu Verfügung gestellt. Es war nicht näher bestimmt.

2.4 Erhaltungskulturen

Das in der Arbeit verwendete *Pythium*-Isolat wurde als Myzelstück in Wasserkulturen, in Erlenmeyerkolben auf Sand-Maisgrieß-Medium und auf Möhrensaftagar bei 15°C aufbewahrt. In 4-wöchigen Zeitintervallen wurde der Pilz vom einen der beiden letztgenannten Medien auf das jeweils andere übertragen.

Die Bakterien wurden als Schrägagarkulturen bei 4°C aufbewahrt. Außerdem wurden Glycerinkulturen durch Vermischen von je 800µl einer dicht bewachsenen Baktereinkultur aus der exponentiellen Wachstumsphase mit 200µl Glycerin in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß hergestellt, die bei -80°C gelagert wurden.

2.5 Anzucht und Vermehrung der Bakterien

2.5.1 Zellkulturen in Erlenmeyerkolben

⁵ Dr. Koch, BBA Darmstadt, persönliche Mitteilung.

Sofern nicht anders angegeben, wurden Zellkulturen von Bakterien bei 28°C auf einem Rotationsschüttler (100rpm) inkubiert.

2.5.2 Zellkulturen im 2l-Fermenter

Mit einem Laborfermentersystem (Biostat MD) der Firma Braun Biotech International GmbH (Melsungen) wurde exemplarisch der Einfluß von Luteolin-7-Glucosid auf das Wachstum des *Pseudomonas fluorescens*-Isolates W34 untersucht. Der Fermenter hatte ein Fassungsvermögen von zwei Litern und war mit autoklavierbaren Sonden zur Messung und Regelung von O₂-Gehalt, pH-Wert und Temperatur während eines Prozesses ausgestattet. Außerdem konnte die Schaumbildung im Kulturgefäß mit einem Sensor erfaßt werden. Zur Feineinstellung der O₂-Bedingungen war ein Airflow-Controller in das System integriert worden.

Steriltechnik:

Eine funktionierende Steriltechnik nimmt nach Storhas (1994) einen hohen Stellenwert in einem biotechnologischen Prozeß ein. Unter ihr versteht man allerdings nicht nur eine sachgerechte Sterilisation, sondern auch ein steriltechnisches Handling des Fermenterzubehörs (z. B. Dichtringe, Sterilfilter, Zu- und Ableitungen, Anschlüsse, Vorlagen-Behälter und Sonden) und geeignete Wartungsmaßnahmen.

Zur Festlegung einer geeigneten Steriltechnik wurden in Vorversuchen zunächst Ansätze mit Kulturmedium (M9) vorbereitet, und das gesamte System anschließend unterschiedlich langen Autoklavierungszeiten ausgesetzt, wobei kleine, mediumgefüllte Erlenmeyerkolben, die anschließend als Nullproben dienten, jeweils mitautoklaviert wurden. In regelmäßigen Abständen wurden vier Tage lang mit einem Handprobennehmer unter sterilen Bedingungen Proben aus dem Kulturmedium gezogen und im Verdünnungsverfahren auf NB-Agar ausplattiert und die sich darauf entwickelnden Bakterienkolonien ausgezählt. Auf diese Weise wurde festgestellt, daß eine Autoklavierungsdauer von mindestens 30min erforderlich ist, um Kulturmedium, Zusatzgefäße und Verbindungsschläuche wirksam zu sterilisieren.

Anzucht von P. fluorescens W34

Der Fermenter wurde mit 0,042g Zellmasse (TG) aus einer über Nacht in einem Erlenmeyerkolben angezogenen Vorkultur des Bakteriums beimpft. Der pH-Wert im Fermenter wurde durch eine pumpengesteuerte Zudosierung einer 1M NaOH -Lösung bzw. einer 1M H₂SO₄-Lösung, die jeweils in einem 200ml-Gefäß vorgelegt wurde, konstant auf 6,2 gehalten. Die Temperaturregelung war auf 28°C eingestellt. Ein Sauerstoffgehalt von 80% wurde durch Kaskadenschaltung von Begasung und Rührer geregelt. Als Antischaummittel wurde nach Adler et al. (1980) Desmophen 3600 Z (Bayer) verwendet, welches schon vor dem Sterilisieren in das Kulturgefäß gegeben wurde (1ml/l Kulturflüssigkeit) um eine Schaumbildung während der 30min dauernden Erhitzung im Autoklaven zu unterbinden. Bei der anschließenden Kultivierung wurde die Schaumbildung über Zudosierung von Desmophen aus einer Vorlage (200ml) über eine Sonde im Kulturgefäß und eine weitere Pumpe gesteuert. Luteolin-7-Glucosid wurde zweimal – in Anlehnung an die Gewächshausversuche in einer Konzentration von 10µmol – verwendet und zu Beginn eines jeden Prozesses zugegeben.

Aufnahme der Wachstumskurven von P. fluorescens W34

Optische Dichte und Lebendkeimzahl: Die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspensionen in den Proben wurde als Extinktion bei einer Wellenlänge von 540nm bestimmt (Spektralphotometer, Uvikon). Beim Überschreiten des Extinktionswertes von 0,5 wurde die Bakteriensuspension mit M9-Medium verdünnt. Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl (LZZ) wurden die Proben stufenweise (1:10) mit sterilem Leitungswasser verdünnt. Je 50µl einer Verdünnungsstufe wurden auf KB-Agar mit mindestens drei Parallelansätzen ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 28°C inkubiert und mit Hilfe eines Tischdurchlichtgerätes die Anzahl der Kolonien bestimmt. Mit Hilfe einer Eichgeraden wurde die OD in die LZZ pro ml umgerechnet, die dann logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen wurde.

Steuerung, Kontrolle und Auswertung dieser Versuche erfolgte mit der Fermenter-Software „MFCS/win“ (Braun Biotech International GmbH, Melsungen).

2.6 Physiologische Charakterisierung der fluoreszierenden Pseudomonaden

2.6.1 Charakterisierung der Pseudomonaden nach BIOLOG™

Um Unterschiede im Spektrum der verwertbaren Substrate der eingesetzten *Pseudomonas* - Isolate zu ermitteln wurde das Bakterien-Identifikationssystem BIOLOG™ (BIOLOG Inc., Hayward, USA) verwendet. In den Vertiefungen der Mikrotiterplatten dieses Systems befinden sich verschiedene C-Quellen und Salze, in die jeweils die Suspension einer Bakterienkultur gegeben wird:

Die über Nacht auf TY-Agar bei 28°C inkubierten Bakterien wurden mit sterilen Wattestäbchen von der Agaroberfläche abgelöst und in einer 0,85%igen NaCl-Lösung suspendiert. Die OD der Suspension wurde – nach den Angaben des Herstellers – auf 0,2 eingestellt. Die Kavitäten einer Mikrotiterplatte für gramnegative Bakterien („GN-Microplate“) wurden jeweils mit Hilfe einer Multipipette mit je 150µl der jeweiligen Bakteriensuspension gefüllt. Pro Platte kann die Verwertung 95 verschiedener Substrate geprüft werden, wobei Wasser als Kontrolle dient. Die Umsetzung eines Substrates wurde jeweils durch den Farbumschlag eines Redoxindikators – eine Violettfärbung – angezeigt.

Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei einer Temperatur von 28°C wurden die Farbreaktionen auf den Platten bonitiert und mit der zugehörigen Computersoftware (MicroLog™) durch einen Vergleich mit einer systemeigenen Datenbank ausgewertet. Anhand des Grades der Übereinstimmung mit den Substratverwertungsmustern in der Datenbank dieses

Systems können Bakterien identifiziert werden. Für eine sichere Identifikation muß der hierzu berechnete Ähnlichkeitsindex „SIM“ mindesten einen Wert von 0,5 aufweisen, maximal kann er den Wert 1,0 annehmen.

2.6.2 Dualkulturen der Pseudomonaden mit *Pythium ultimum* (Antibiose-Test)

Als Testmedien wurden King B-Agar, PDA-Agar, TSA-Agar und M9-Agar eingesetzt. Bakterien und Pilz wurden vor den Versuchen auf dem jeweiligen Medium kultiviert.

Die potentiellen Antagonisten *Pseudomonas fluorescens* W5, W24 und W34 wurden in der Mitte einer Petrischale strichförmig aufgetragen und 24 Stunden bei 28°C inkubiert. *Pythium ultimum* wurde in Form von zwei physiologisch gleichalten Myzelstücken auf jede Seite des Impfstriches in 35mm Entfernung auf den Agar aufgesetzt. Wiederum wurden die Platten bei 28°C inkubiert.

Die Testauswertung erfolgte zu dem Zeitpunkt, als das Pilzmyzel in den Kontrollschalen zusammengewachsen war. Antibiotische Eigenschaften der Bakterien wurden als Hemmhof zwischen der Koloniefrent des Pilzes und dem Rand des strichförmig gewachsenen Bakteriums festgehalten. Pro Ansatz wurden sechs Agarplatten und eine Kontrollplatte ohne Bakterium verwendet.

2.7 Identifizierung des verwendeten *Pythium*-Isolates

Für die Festlegung adäquater Bedingungen beim Einsatz des pathogenen Pilzes in Pflanzentests war es notwendig, das in Hohenheim isolierte aber nicht näher bestimmte *Pythium*-Isolat zu identifizieren.

Makroskopisch erfolgte zunächst die Beschreibung der Koloniecharakteristika nach Anzucht auf MÖS-Agar. Anschließend wurde einerseits die Lichtmikroskopie, andererseits die PCR zur Determination des *Pythium*-Isolates verwendet.

2.7.1 Lichtmikroskopie

Die morphologischen Merkmale des *Pythium*-Isolates wurden anhand der bei Van der Plaats-Niterink (1981) aufgeführten Kriterien untersucht.

Mikroskopisch wurden folgende Charakteristika der Fortpflanzungsorgane nach Anzucht in MBÖ-Medium bestimmt:

- Vorkommen, Größe und Form der Sporangien
- Ornamentierung, Größe, Form und Lage der Oogonien
- Form und Lage der Antheridien, außerdem deren Anzahl pro Oogonium
- Größe und Wandstärke der Oosporen
- Breite der Hyphen

Zur Kontrastierung wurden einige Präparate mit Safranin (Bandoni 1979) gefärbt. Hierzu wurde ein Tropfen Safranin-Lösung und ein Tropfen KOH (3%) auf einem Objektträger gemischt. Das frische Pilzmaterial wurde in diese Mischung gegeben und mit einem Deckglas versehen. Die Färbemethode dient zwar vorwiegend zur Verdeutlichung der Zellkerne (Kreisel und Schauer 1987), konnte hier aber zur allgemeinen Kontrastierung der pilzlichen Strukturen eingesetzt werden.

Für die Untersuchungen stand ein Mikroskop des Types Diaplan (Leitz) zur Verfügung. Die Dokumentation erfolgte mit einer Mikrocamera MPS 12 (Wild).

2.7.2 Genomanalyse

Zur Ergänzung der morphologischen Identifikation des *Pythium*-Isolates wurde eine molekularbiologische Differenzierungsmethode eingesetzt, die bereits bei einigen *Pythium*-Arten (Chen et al. 1992, Wang und White 1997) erfolgreich angewendet wurde. Hierbei erfolgte die Genomanalyse nicht auf direkte Art durch Basensequenzierung, sondern – nach Durchführung der *polymerase chain reaction* (PCR) – indirekt durch die Untersuchung von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLPs) der Spacer-Regionen der rDNA, die bei eng verwandten Organismen unterschiedlich sind.

Das zu untersuchende *Pythium*-Isolat wurde für die molekularbiologische Analyse auf MÖS-Agar bei 28°C angezogen. Nach drei Tagen wurde das Myzel unter Verwendung eines Stereomikroskopes mit einer feinen Pinzette vorsichtig gesammelt, wobei nur Myzel verwendet wurde, das nicht in direktem Kontakt mit der Agaroberfläche wuchs. Das Myzel wurde in Reaktionsgefäßen eingefroren, lyophilisiert und anschließend bei –80°C aufbewahrt.

In Anlehnung an die bei Redecker (1995) beschriebene Methodik wurde das Myzel aufgearbeitet und in der PCR eingesetzt: In einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Reaktionsgefäß wurde das lyophilisierte Myzel mit einem Mikropistill zerkleinert, mit 100µl Wasser versetzt und in einem kochenden Wasserbad 1min inkubiert. Nach Zugabe von RNase A und einer erneuten Inkubation für 10min bei 65°C wurde der Ansatz nochmals 3min in ein kochendes Wasserbad gegeben und anschließend 1min zentrifugiert (Biofuge A, Heraeus,

Osterode). Je 2µl des Überstandes wurden in der PCR verwendet. Zur Amplifizierung der ITS-Region der rDNA des *Pythium*-Isolates wurden die bei White et al. (1990) beschriebenen Primer ITS1 und ITS4 eingesetzt. Beide wurden von der Abteilung für Mikrochemie des Institutes für Molekularbiologie und Tumorforschung (Marburg) hergestellt. Die PCR wurde in 0,5ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50µl enthielt 2µl Myzelextrakt, 50µM dNTP (Desoxynukleotidphosphate), 0,2µM von jedem Primer (ITS1, ITS4), 4 U (Einheiten) der *Taq*-DNA-Polymerase und eine PCR-Pufferlösung (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1,5mM MgCl und Gelatine (1mg/ml)). Um eine Verdunstung zu verhindern, wurde das Reaktionsgemisch mit 30µl Mineralöl überschichtet. Die in Tab. 2.1 beschriebenen Parameter wurden für die PCR zur Amplifikation der ITS-Region eingestellt: Zur Kontrolle der Temperaturzyklen wurde ein TC 1-Thermocycler (Perkin Elmer Bodenseewerk, Langen) verwendet.

Tab. 2.1 Programmierung des Thermocyclers bei der Amplifizierung der ITS-Region.

Reaktionsschritt	Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
initiale DNA-Denaturierung	1	150 s	95°C
Zyklen:	5		
DNA-Denaturierung		30 s	95°C
Primer Annealing		30 s	52°C
Extension		60 s	72°C
DNA-Denaturierung	30	30 s	95°C
Primer Annealing		30 s	51°C
Extension		60 s	72°C
Auffüllen der Ketten	1	320 s	72°C

Die Effektivität der Amplifikation wurde anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese von 5µl des PCR-Reaktionsgemisches aufgezeigt. Hierzu wurde ein Agarose-Gel (1,5%) in Tris-Borat-EDTA-Puffer (0,89mM Tris-HCL, 0,89mM Borsäure und 2mM EDTA), benutzt, das anschließend mit Ethidiumbromid (5mg/ml) angefärbt und unter Verwendung eines Transilluminators (TMZ, UVP, San Gabriel, USA) unter UV-Licht (254nm) ausgewertet wurde.

Um die RFLPs zu bestimmen, wurde zunächst das Mineralöl in den PCR-Produkten mit 50µl eines Chloroform-Octanol-Gemisches (24:1 (v:v)) entfernt. Die Amplifikate wurden dann

durch Zugabe von Ethanol (2,5 Volumina), 1µl Glycogen (20mg/ml) und 3M Natriumacetat über Nacht bei –20°C gefällt. Nach einer Zentrifugation (30min bei 13000g, 4°C) wurde das Sediment mit Ethanol (70%) gewaschen und in aqua bidest. aufgenommen. Je 10µl eines Amplifikates wurden anschließend mit Restriktionsenzymen geschnitten. Das Volumen eines jeden Ansatzes betrug hierbei insgesamt 20µl. Eingesetzt wurden in Anlehnung an Chen et al. (1992) die Restriktionsenzyme MboI (Schnittstelle: /GATC) und TaqI (Schnittstelle: T/CGA). Die Reaktionsgemische wurden nach sechstündiger Inkubation auf Agarose-Gelen (4%) aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele angefärbt und unter Verwendung eines Transilluminators, wie oben geschrieben, ausgewertet. Zur Dokumentation wurden Fotografien mit einer Polaroid-Kamera (Cu5, Polaroid, St. Albans, Großbritannien) erstellt, die auch in digitalisierter Form gespeichert wurden.

2.8 Besiedelungsstudien mit fluoreszierenden Pseudomonaden

2.8.1 Inokulation der Objekte mit Pseudomonaden

Verschiedene Applikationsverfahren wurden angewendet: zum einen eine Tauchbehandlung von Samen und Keimlingswurzeln mit einer reinen Bakteriensuspension und zum anderen eine Inkrustierung von Samen mit einem Gemisch aus einer Bakteriensuspension und einer Gummi-Arabicum-Lösung. Der Titer der Bakteriensuspension wurde jeweils direkt vor deren Einsatz durch Verdünnungsausstriche bestimmt und als Initialtiter angegeben.

2.8.1.1 Tauchbehandlung von Samen und Keimlingswurzeln

Mit H₂O₂ oberflächensterilisierte Gurkensamen (siehe 2.9.2.1) wurden in je einen Eppendorf-Cup mit 1ml einer Bakteriensuspension getaucht. Die Samen wurden jeweils fünf Minuten bei 28°C inkubiert. Zur Bakterisierung von Keimlingswurzeln wurde ebenso verfahren, wobei zwei Tage alte, sterile Keimlinge eingesetzt wurden. Zu beachten war, daß nur die Wurzel, nicht aber der Samen in die Bakteriensuspension eingetaucht wurde.

2.8.1.2 Inkrustierung von Samen mit Gummi Arabicum

Oberflächensterilisierte Gurkensamen wurden in Eppendorf-Cups einzeln mit einer definierten Suspension des jeweiligen Bakterienisolates aus einer Übernacht-Kultur in einer Gummi Arabicum-Lösung (10%) im Volumenverhältnis 2:1 inkrustiert. Die Behandlungsdauer betrug in Anlehnung an die für die späteren Gewächshausversuche optimierte Sameninkrustierung 45 min. Nach einer Trocknungsdauer von einer Stunde wurden die behandelten Samen in Petrischalen auf Hoagland-Gelrite ausgelegt und zwei bis vier Tage bei 28°C kultiviert.

2.8.2 Rasterelektronenmikroskopie von behandelten Samen und Keimlingswurzeln

Die Rasterelektronenmikroskopie fand Verwendung zur Untersuchung der Effektivität der Saatgutbehandlung mit Pseudomonaden sowie zur Untersuchung der Besiedelung der Keimlingswurzeln nach Tauch- bzw. Samenbehandlung mit Bakterien. Exemplarisch wurden die Stämme *P. fluorescens* W24 und W34 eingesetzt. Hierfür stand ein Rasterelektronenmikroskop der Firma Camscan (Serie IV) zur Verfügung. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit Agfapan APX 100-Filmen (Agfa) auf Brovira-Speed-Papier (Agfa). Die Aufnahmen wurden auch in digitalisierter Form gespeichert.

2.8.2.1 Herstellung der Präparate

Zunächst wurde das Material (Samen bzw. Keimlingswurzeln) über einen Zeitraum von drei Stunden in Fixans (Glutaraldehyd) eingelegt⁶. Anschließend wurden die Proben zwei Stunden gewässert, wobei das Leitungswasser viermal gewechselt wurde. Über Nacht verblieben die Präparate in Ethylenglykolmonoethylether. Im nächsten Schritt wurde dieser durch wasserfreies Aceton (über CuSO₄ getrocknet) ersetzt, wobei das Aceton über einen Zeitraum von zwei Stunden sechsmal gewechselt wurde. Anschließend wurde das Aceton nach Anleitung des Herstellers in einer Polaron E 3000-Apparatur (Fa. Balzers Union) durch Kohlendioxid ersetzt und dieses nach der „Critical-Point“-Methode bei 34°C und 73bar unter kontrollierten Bedingungen vom flüssigen in den gasförmigen Zustand überführt. Die getrockneten Proben wurden auf einem Stiftprobenhalter mit Hilfe von Graphit-Leit-Tabs befestigt und im Sputter Coater (AUTO 360, Edwards) nach Anleitung des Herstellers mit Gold beschichtet.

2.8.2.2 Mikroskopierte Präparate

⁶ Die angewendete Einfachfixierung mit Glutaraldehyd wurde in Vorversuchen mit einer Doppelfixierung verglichen, bei der zusätzlich Osmiumtetroxid (OsO₄, Roth, Karlsruhe) eingesetzt wurde. OsO₄ erhöht im allgemeinen die Leitfähigkeit des Präparates und führt zudem zu einer besseren Sekundärelektronenausbeute (Robinson et al. 1987). Da die Aufnahmen von einfach- im Vergleich mit doppelfixierten Präparaten keinen Qualitätsunterschied aufwiesen, wurde im Weiteren nur die Einfachfixierung durchgeführt.

Gurkensamen und -keimlingswurzeln wurden nach dem in Tab. 2.2 angegebenen Schema mit Suspensionen der *Pseudomonas fluorescens*-Isolate W34 und W24 behandelt, wobei der Ausgangstiter jeweils bestimmt wurde. Außerdem wurden Wurzeln mikroskopiert, die aus bakterienbehandelten Samen gekeimt sind, wie sie auch bei späteren Gewächshausversuchen verwendet wurden. Hierdurch konnte eine mögliche Proliferation der Pseudomonaden auf den Wurzeloberflächen untersucht werden.

Tab. 2.2 Ausgangsparameter der mikroskopierten Präparate.

Objekt	Bakterienisolat und Titer	Behandlungsvariante
Gurkensamen	<i>P. fluorescens</i> W34 ($1,4 \times 10^8$ cfu/Samen) <i>P. fluorescens</i> W24 ($1,8 \times 10^8$ cfu/Samen)	Tauchbehandlung (5min)
Gurkenkeimlings- wurzeln	<i>P. fluorescens</i> W34 ($1,1 \times 10^9$; $1,3 \times 10^8$; $2,0 \times 10^7$; $2,2 \times 10^6$ cfu/Wurzel) <i>P. fluorescens</i> W24 ($1,2 \times 10^8$ cfu/Wurzel)	Tauchbehandlung (5min)
	<i>P. fluorescens</i> W34 ($5,2 \times 10^8$ cfu/Samen) <i>P. fluorescens</i> W24 ($6,5 \times 10^8$ cfu/Samen)	Inkrustierung der Samen (45min) und 2-tägige Keimung

2.8.3 Rückisolierung der Pseudomonaden

Für die Einschätzung der Besiedelungsstärke unterschiedlicher Bakterienstämme wurde der nach Applikation von Pseudomonaden auf Gurkensamen und Wurzeloberflächen vorhandene Bakterientiter bestimmt. Hierfür wurden die Objekte, wie im folgenden näher beschrieben,

30min in einem Ultraschallbad⁷ bei 35kHz behandelt. Pro Behandlungsvariante wurden 10 Samen bzw. Keimlinge verwendet.

Rückisolierung von Pseudomonaden auf Samen und Wurzeloberflächen nach Tauchbehandlung

Die mit Bakteriensuspensionen tauchbehandelten Samen wurden in sterilem Leitungswasser gespült, so daß nur diejenigen Bakterien einer Rückisolierung unterzogen werden konnten, die sich während der Behandlung aktiv an die Samenoberfläche angehaftet hatten. Ebenso wurde mit den tauchbehandelten Keimlingswurzeln verfahren, die zuvor mit einem sterilen Skalpell vom Samen getrennt wurden. Jedes Objekt wurde in ein mit 10ml sterilem Leitungswasser gefülltes Reagenzglas gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30min im Ultraschallbad wurden jeweils mehrere Verdünnungsstufen hergestellt, von denen Aliquots von 50µl auf KB-Agar ausplattiert wurden. Die Agarplatten wurden zwei Tage bei 28°C kultiviert und anschließend die Zahl der Kolonien bestimmt.

Rückisolierung von Pseudomonaden auf Wurzeloberflächen nach Keimung inkrustierter Samen

Nach zwei- bzw. viertägiger Keimung der Gurken nach der Sameninkrustierung wurden die Pseudomonaden von den Wurzeln rückisoliert, indem ebenfalls die Keimlingswurzeln mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten und jede Wurzel wie oben beschrieben weiterbehandelt wurde.

2.9 Aufbau eines standardisierten Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystems

2.9.1 Standardisierung der Saatgutbehandlung

2.9.1.1 Festlegung der Sterilisierungstechnik

Eine wichtige Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit von Pflanzentests ist die Festlegung einer geeigneten Sterilisierungstechnik für das verwendete Saatgut. Diese sollte möglichst effektiv sein, wobei die Keimraten der sterilisierten Samen nicht beeinträchtigt werden dürfen, da sonst in Gewächshausversuchen mit künstlichen *Pythium*-Infektionen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, die zu bestimmenden Werte für die Auflaufraten und Wachstumsparameter der Pflanzen verfälscht würden. Um eine optimale Sterilisierungstechnik

⁷ Diese Rückisolierungstechnik wurde in Vorversuchen optimiert, in denen die Dauer der Inkubation im Ultraschallbad zwischen 5 und 45min variiert wurde.

festlegen zu können, wurden je 32 Samen von *Cucumis sativus* unterschiedlich lange (1, 5, 10 und 15min) und in unterschiedlich konzentrierten H₂O₂-Lösungen (15 und 30%, Riedel-de Haën, Seelze) geschüttelt. In allen Fällen wurden die Samen anschließend viermal mit Leitungswasser, danach nochmals zehnmal mit sterilem Leitungswasser gespült. Die so behandelten Samen wurden unter der Sterilbank getrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C in sterilen Petrischalen aufbewahrt.

Zur Überprüfung der Effektivität der verschiedenen Sterilisationsvarianten wurden die Samen auf NB-Agarplatten ausgelegt und vier Tage bei 28°C inkubiert, wobei jeden Tag der Anteil der kontaminierten bzw. sterilen Samen pro Behandlungsvariante bestimmt wurde. War die angewendete Variante nicht effektiv genug, breiteten sich Bakterienhöfe um die Samen herum aus.

Nach Festlegung der Sterilisierungstechnik wurde diese vor Anwendung neuer Samenchargen jeweils überprüft und gegebenenfalls durch weitere Keimungsversuche auf Agar und im Boden korrigiert. Die Keimfähigkeit sterilen Saatgutes wurde wie unter Kap. 2.9.2 beschrieben ebenfalls überprüft.

2.9.1.2 Saatgutbehandlung bei den Gewächshausversuchen

Da für die in dieser Arbeit angeführten Gewächshausversuche aus statistischen Gründen jeweils große Mengen an bakterisiertem Saatgut verwendet werden sollten, war es notwendig, eine praktikable Methode zur effektiven Behandlung von größeren Portionen von Saatgut zu entwickeln. Hierzu wurden oberflächensterilisierte Gurkensamen in Portionen von 100 Stück eingeteilt und in speziell präparierten 400ml-Bechergläsern mit dem jeweiligen Bakterienstamm behandelt. Die Bechergläser waren mit Gaze-Material vollständig ausgekleidet, welches mit einem Metallring beschwert und somit jeweils an den Boden und an die Wände der Gläser gedrückt wurde. Nach Autoklavieren der Gläser wurde die jeweilige Inkrustierungssuspension aus Bakterien, gemischt mit einer 10%igen Gummi Arabicum-Lösung eingefüllt und die zu behandelnden sterilen Samen hinzugegeben. Das Volumenverhältnis von Bakteriensuspension und Gummi Arabicum-Lösung war 2:1. Nach 45min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Samen zusammen mit der Gaze aus dem Becherglas gehoben und vor dem Einsäen eine Stunde getrocknet. Zur Überprüfung der Effektivität dieser Methode wurden nach Behandlung mit den verschiedenen Bateriaisolaten jeweils mit einem Teil der Samen Rückisolierungen durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurden sowohl die drei *Pseudomonas fluorescens*-Isolate W5, W24 und W34 als auch die Isolate *Pseudomonas putida* I 112 und *Pseudomonas chlororaphis* II 232 eingesetzt.

Die Inkrustierungsdauer von 45min wurde erst nach Durchführung von Vorversuchen festgelegt, bei denen exemplarisch *P. fluorescens* W34 eingesetzt wurde, wobei die einzelnen Varianten im Bereich zwischen 5 und 60min lagen. Die Effektivität dieser Behandlungen wurde jeweils durch Rückisolierung des Bakteriums bestimmt. Eine Inkrustierung von 45min Dauer erwies sich in den Vorversuchen als effektivste Applikationsmethode, denn bei einem Initialtiter von $3,3 \times 10^9$ cfu/ml waren nach Trocknung der Samen durch Rückisolierung (n=10) hier die

höchsten Zellzahlen von durchschnittlich $2,1 \times 10^7$ cfu/Samen nachzuweisen, im Vergleich zu $1,7 \times 10^6$ (nach 5min), $1,1 \times 10^7$ (nach 30min) und $5,9 \times 10^6$ (nach 60min).

2.9.2 Überprüfung der Saatgutkeimfähigkeit von *Cucumis sativus*

Unsterile, sterile und bakterienbehandelte Gurkensamen wurden auf ihre Keimfähigkeit geprüft, indem 100 Samen jeder Variante in Petrischalen mit Wasseragar ausgelegt wurden. Die Schalen wurden verschlossen und bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Keimrate nach 48 Stunden, vier und sieben Tagen ausgezählt.

2.9.3 Bestimmung und Festlegung der Wasserkapazität der Topferde

Die Wasserkapazität des verwendeten Erde-Sand-Substrates wurde nach der Methode von Öhlinger (1993) bestimmt. Hierzu wurde 30g des gesiebten Substratgemisches in einen zu diesem Zweck angefertigten Kunststoffzylinder (Höhe: 15cm, Ø 5cm), der an einer Seite mit feinmaschigem Nylon verschlossen war, eingewogen. Der gefüllte Zylinder wurde eine Stunde in ein mit Wasser gefülltes Becherglas gestellt, so daß der Wasserspiegel außen etwas höher als die plane Bodenoberfläche im Rohr lag. Nach Durchstau des Wassers wurde die Probe drei Stunden auf ein mit Wasser vollständig gesättigtes Sandbad mit Ablauf gestellt, wobei die gesamte Vorrichtung zugedeckt wurde (Verdunstungsschutz). Aus der Gewichtszunahme und der nebenher bei 80°C getrockneten Substratprobe wurde die maximale Wasserkapazität (WK_{max}) bestimmt.

2.9.4 Festlegung der abiotischen Bedingungen

Bodenwassergehalt

Um dem pathogenen Pilz optimale Infektionsbedingungen zu bieten, wurde für das Erde-Sand-Substrat eine Wasserkapazität von 60% der WK_{max} festgelegt, welche bis zum Versuchsende täglich gravimetrisch überprüft und durch Zugabe von Wasser auf diesem Niveau gehalten

wurde. Pro 1kg frisch hergestelltem Erde-Sand-Substrat war ein Volumen von 275ml Wasser hinzuzugeben, um den gewählten Bodenwassergehalt einzustellen.

Temperaturen im Gewächshaus

Die Tagestemperaturen lagen im klimatisierten Gewächshaus zwischen 22 und 25°C. Die Nachttemperatur sank nicht unter 20°C.

Licht-Dunkel-Phasen

Die Pflanzen waren einer Photoperiode von 13h Licht und 11h Dunkelheit ausgesetzt, wobei Natriumdampflampen (SON-T Agro 400 W, Philips, Hamburg) eingesetzt wurden, welche bei einer Leuchtdichte von 550cd/cm² eine Beleuchtungsstärke von 18000lx auf einer Höhe von 10cm über dem Bodensubstratniveau gewährleisteten.

2.9.5 Entwicklung eines Verfahrens zur Erzeugung reproduzierbarer *Pythium*-Infektionen

2.9.5.1 Produktion des *Pythium*-Inokulums

MBÖ-Kolben⁸ (300ml) wurden mit je einem Myzelstückchen (Ø10mm) von *P. ultimum* aus einer jungen Agarkultur beimpft und 72h auf einem Rotationsschüttler (100rpm) inkubiert. Die Myzelballen wurden geerntet und in Leitungswasser mit einem Dispersionsgerät (Waring Blender, New Hartford, Connecticut, USA) fein zerkleinert. Die Inokulationssuspension enthielt deshalb neben Myzelbruchstücken auch Sporangien und Oosporen des Testpilzes und wurde bei allen Gewächshausexperimenten eingesetzt.

2.9.5.2 Pflanzenanzucht und Bodeninokulation mit *Pythium*

Die Aussaat steriler Gurkensamen erfolgte in Bodensubstrat, das einerseits aus kommerziell erhältlicher Blumenerde (Floragard, Oldenburg) bestand, die einen Torfmoosanteil aufwies und mit Tonmineralien, Makro- und Mikronährstoffen versetzt war (pH 6,2), und andererseits aus gedämpftem, gewaschenem Sand (Botanischer Garten, Marburg). Erde und Sand wurden im Volumenverhältnis 2:1 gemischt. Dieses Bodensubstrat wurde unverändert (für die Kontrollen) oder mit frischem *Pythium*-Inokulum verwendet. Die inokulierten Varianten wurden durch sorgfältiges Untermischen von Leitungswasser, das fein verteilte Bruchstücke des pathogenen

⁸ Das diesem Nährmedium zugesetzte Weizenkeimöl enthält Sterole, die die Fortpflanzung von Oomyceten induzieren (Haskins et al. 1964, Hendrix und Campbell 1973) und anormales Wachstum *in vitro* verhindern (Hendrix 1974, Ayers und Lumsden 1975).

Pilzes enthielt (siehe Kap. 2.9.5.1), hergestellt. Das *Pythium*-Inokulum wurde in definierten Mengen (0,01-0,25g Frischgewicht/320g Bodensubstrat) eingesetzt.

In Vorversuchen wurde außerdem Erde mit myzelbewachsenen Agarplatten nach der Methode von Vogt (1994)⁹ beimpft und nach vier Wochen ebenfalls die Auflaufraten der Pflanzen bestimmt. Die Versuche waren jedoch nicht reproduzierbar, denn in Wiederholungsexperimenten zeigten sich die Auflaufraten extrem unterschiedlich, so daß eine statistische Auswertung nicht durchgeführt werden konnten und die Methode deshalb in dieser Arbeit nicht weiter angewendet wurde.

2.9.5.3 Zeitspanne zwischen Bodeninokulation und Aussaat

In den Infektionstests wurde der Einfluß dreier unterschiedlicher Zeispannen zwischen Inokulation des Bodens mit *Pythium* und Aussaat der Gurkensamen untersucht. Bei der ersten Variante lagen zwischen Bodeninokulation und Aussaat vier Stunden, bei der zweiten wurde diese Zeitspanne auf 24 Stunden verlängert. In der dritten Variante fand die Aussaat der Gurkensamen direkt nach der Inokulation des Bodens mit *Pythium* statt. Bei allen Varianten wurde jeweils die Auflaufrate der Keimlinge nach vier Wochen bestimmt.

2.9.5.4 Nachweis von *Pythium* im Boden

Um Anhaltspunkte über die Entwicklung des *Pythium*-Inokulums während der Infektionstests zu erhalten, wurde die Inokulumdichte nach künstlicher Bodeninokulation untersucht. Gurkensaatzgut wurde in Erde-Sand-Substrat mit einer Inokulummenge von 0,25g FG/320g Bodensubstrat von *Pythium ultimum* ausgesät. Am Tag der Aussaat, nach zwei und nach vier Wochen wurden mehrere Erdproben je Ansatz entnommen und zu jeweils einer Probe gemischt. Die Bodenproben wurden bis zu einer Partikelgröße von 1mm gesiebt, und je Probe wurden 5g in 10ml sterilem Leitungswasser suspendiert. Mehrere Verdünnungsstufen dieser Ausgangssuspension wurden zu jeweils 100µl pro Petrischale auf SA-PCNB-Agar ausgestrichen und zwei Tage bei 28°C inkubiert. Die Agarplatten wurden dann mit sterilem Leitungswasser abgespült. Nach weiteren zwei Tagen Inkubation erfolgte die Auszählung der *Pythium*-Kolonien im Agar.

⁹ Aus einer CMS-Kultur wurden MÖS-Agar-Platten beimpft und 4 Tage bei 28°C inkubiert. Nach dieser Zeit waren die Platten vollständig mit Myzel bewachsen. Um eine für reproduzierbare Infektionen geeignete *Pythium*-Inokulummenge zu bestimmen, wurden unterschiedliche Mengen dieser myzelbewachsenen Agarplatten zur Bodenbeimpfung verwendet. Jeweils eine ganze Platte oder Teile einer solchen Platte (3/4, 1/2 und 1/4) wurden als *Pythium*-Inokulum pro Blumentopf (Ø 10cm) verwendet. Insgesamt wurden also vier verschiedene *Pythium*-Mengen eingesetzt. Jeder Topf wurde zunächst zu 70% mit Erds substrat gefüllt, auf der Substratoberfläche wurde der mit Myzel bewachsene Agar verteilt, mit einer 1,5cm dicken Substratschicht bedeckt und mit Leitungswasser befeuchtet. Nach dreitägiger Inkubation im Gewächshaus (20-25°C) wurden die Gurkensamen ausgesät, wobei pro Topf zehn Samen und pro Ansatz jeweils 20 Töpfe verwendet wurden. Jeder Ansatz wurde einmal wiederholt.

2.10 Quantifizierung des antagonistischen Potentials verschiedener Pseudomonaden gegenüber *Pythium ultimum* im Gewächshaus-Testsystem

2.10.1 Pflanzenanzucht

In Anlehnung an die Vorversuche zur Reproduzierbarkeit der Infektionen nach künstlicher Bodeninokulation mit *Pythium* (siehe Kap. 3.4.3.1) wurde in allen Versuchen eine *Pythium*-Inokulummenge von 0,25g FG/320g Bodensubstrat verwendet und die Gurkensamen direkt nach der Verseuchung des Bodens ausgesät. Eine daraus resultierende Auflaufrate von 23% diente als Ausgangswert für die Quantifizierung des antagonistischen Potentials der ins Testsystem eingebrachten Pseudomonaden. In den nicht mit *Pythium* inokulierten Kontrollvarianten wurde nur die für 60% der WK_{max} des Bodensubstrates nötige Menge Leitungswasser untergemischt. Das für jede Behandlungsvariante hergestellte Bodensubstratgemisch wurde in Topfanzuchtplatten (Quickpot QP 66, Fa. Hermann Meyer, Rellingen) mit je 54 Vertiefungen (je 50 × 56mm) gegeben. In jedes Pflanzloch wurde ein Samen eingesät, pro Behandlungsart wurde eine Pflanzschale verwendet. Bei diesen Versuchen kamen alle fünf *Pseudomonas*-Isolate zum Einsatz. Jeder Ansatz wurde dreimal wiederholt und die Pflanzschalen wurden randomisiert im Gewächshaus aufgestellt.

2.10.2 Bestimmung der Auflaufraten und Wachstumsparameter

Vier Wochen nach der Aussaat – die meisten Pflanzen hatten zu diesem Zeitpunkt drei Blätter entwickelt – wurde die Zahl der gesunden Keimlinge bestimmt. Anschließend wurden die

Sprosse direkt über dem Substratniveau abgeschnitten und die Wurzeln aus der Erde entnommen. Sprosse und Wurzeln wurden bei 80°C getrocknet und gewogen.

2.10.3 Statistische Auswertung

Alle Gewächhausversuche zeichneten sich durch ein randomisiertes Versuchsdesign aus. Jeder Versuch wurde zweimal durchgeführt und jede Behandlungsvariante dreimal wiederholt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte der einzelnen Wiederholungen. Die statistische Analyse der aus den Gewächshausversuchen gewonnenen Daten wurde mit dem Statistikprogramm SPSS für MS WINDOWS (Version 6.1) durchgeführt. Um die Auflaufraten der Kontrollen und der einzelnen Behandlungsvarianten zu vergleichen, wurde der χ^2 -Vierfelder-Test verwendet. Die auf das Pflanzenwachstum bezogenen Parameter wurden einer Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen, entsprechend derer folgende Tests zur Feststellung von Signifikanzen ausgewählt werden konnten:

Signifikante Unterschiede im Sproßtrockengewicht und in der Sproßlänge wurden durch Anwendung des Mann-Whitney-U-Test aufgezeigt. Zur entsprechenden Analyse der Daten über das Wurzeltrockengewicht und die Gesamtbiomasse wurde Duncan's Multiple Range-Test verwendet. Die errechneten Signifikanzen sind in den Tabellen und Grafiken jeweils gekennzeichnet und beziehen sich immer auf eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

2.11 Gewinnung phenolischer Substanzen aus den Wurzel-exsudaten von Gurkenkeimlingen

2.11.1 Kultivierung der Pflanzen

Oberflächensterilisierte Gurkensamen wurden zur Keimung auf Hoagland-Gelrite ausgelegt und für zwei bis drei Tage bei 28°C inkubiert. Eine Senkrechtstellung der Agarplatten (Ø 16cm) gewährleistete hierbei einen geradlinigen Wuchs der Wurzel entlang der Gelrite-Oberfläche. Nach der Inkubation wurden die Keimlinge, deren Wurzeln nun durchschnittlich 1,5cm lang waren, in größere Agarplatten überführt, die, wie in Abb. 2.1 skizziert, mit Cellulose-Acetat-Filtern (OE 66 Schleicher & Schüll, Dassel; Sartorius Göttingen) bestückt waren.

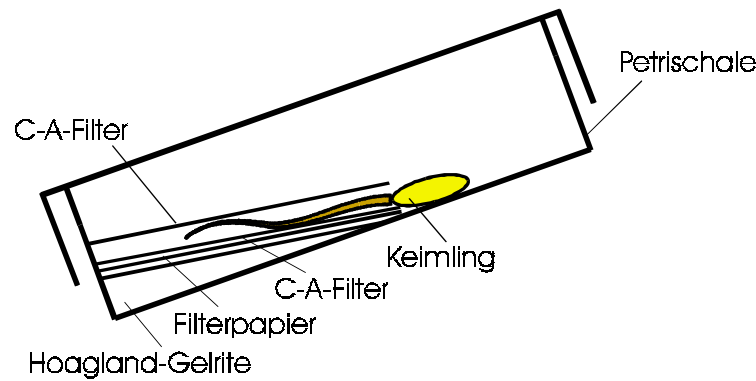


Abb. 2.1 Querschnitt durch eine Petrischale mit spezieller Anordnung von Cellulose-Acetat-Filtern und Keimlingen zur Gewinnung von Wurzelexsudat.

Die Schrägschicht aus Hoagland-Gelrite wurde mit einem feuchten, sterilen Filterpapier bedeckt. Darüber wurde ein ebenfalls steriler, mit MES-Puffer angefeuchteter Cellulose-Acetat-Filter gelegt, auf den die Wurzeln der Gurkenkeimlinge mit einer sterilen Pinzette plaziert wurden. Ein weiterer Cellulose-Acetat-Filter wurde zur Abdeckung der Wurzeln verwendet. Die Keimlingswurzeln wuchsen also in engem Kontakt mit den beiden Cellulose-Acetat-Filtern.

Pro Schale wurden acht Keimlinge ausgelegt; für jede Probe wurden insgesamt 80 Keimlinge verwendet, die vier Tage in einer Klimakammer (14 Std. Licht der Lichtstärke $195 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ bei 25°C und 10 Std. Dunkelheit bei 20°C ; 75% Luftfeuchtigkeit) inkubiert wurden. Bei einem Ansatz wurde vergleichsweise die Kultivierungsdauer auf sieben Tage erhöht (Tab. 2.3). Jeder Ansatz wurde zweimal wiederholt.

Für die Gewinnung unterschiedlicher Exsudatproben wurden Samen und Keimlinge zum Teil Spezialbehandlungen unterzogen. Alle Behandlungsvarianten sind in Tab. 2.3 aufgeführt. Eine siebentägige Kultivierungsdauer wurde nur bei einer Variante (A_2) aus Vergleichsgründen gewählt. Alle anderen Proben beziehen sich auf eine Kultivierungsdauer von vier Tagen, da dies der Zeitspanne entspricht, die die Keimlinge benötigten, um unter Praxisbedingungen im Gewächshaus aufzulaufen, die folglich für die Untersuchung von Interaktionen im Wurzelbereich von besonderer Relevanz war.

Tab. 2.3 Behandlungsvarianten für die Gewinnung von Wurzelexsudat.

Variante	Behandlung der Samen/Keimlinge	Kultivierungsdauer (d)
A_1	unbehandelte Keimlinge	4
A_2	unbehandelte Keimlinge	7
B	mit <i>Pseudomonas fluorescens</i> W24 behandelte Samen	4

C	mit <i>Pythium ultimum</i> behandelte Keimlinge*	4
D	Kombinationsbehandlung aus B und C	4

* Die Keimlingswurzeln wurden zur Inokulation mit *Pythium ultimum* noch vor der Übertragung auf Cellulose-Acetat-Filter mit einer Suspension (30µl/Wurzel) aus infektiösen Einheiten des Pilzes, die in MBÖ-Medium produziert wurden (siehe Kap. 2.9.5.1), benetzt.

Vor dem standardgemäßen Einsatz dieser Kultivierungsmethode in dieser Arbeit, wurde ein Vergleich der Effektivität verschiedener methodischer Varianten¹⁰ mit unbehandelten Keimlingen in Vorversuchen angestellt. Hierzu wurden von Exsudatproben aller methodischen Varianten mit Hilfe der HPLC Chromatogramme aufgenommen. Die oben beschriebene und schließlich bei allen Proben angewendete Methode erwies sich hinsichtlich der Menge und der Reinheit des gewonnenen Exsudates schließlich als optimal.

2.11.2 Extraktion phenolischer Substanzen aus Cellulose-Acetat-Filtern

Die Cellulose-Acetat-Filter wurden in demineralisiertem Wasser gespült und zur Entfernung der aliphatischen Kohlenwasserstoffe kurz in Hexan getaucht. Anschließend erfolgte die Extraktion der phenolischen Substanzen durch Inkubation der Filter in 90%igem Methanol für drei Minuten im Ultraschallbad und für 2min in 100%igem Methanol. Die Methanolfractionen wurden über einen Glasfaser-Filter (Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert und im Rotationsverdampfer (Rotavapor, Büchi 461, Laboratoriumstechnik AG, Flawil, Schweiz) bei 45°C bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft. Der Rückstand wurde in 2ml Methanol aufgenommen, in ein Schraubdeckelfläschchen mit Teflondichtung (Zinsser Analytik, Frankfurt) überführt und in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac Concentrator, Savant, USA) getrocknet. Alle Proben wurden bis zum Gebrauch bei –20°C gelagert.

2.11.3 Verfahren zur Analyse des Wurzelexsudates

2.11.3.1 HPTLC/UV-Spektroskopie

¹⁰ a) Kultivierung ohne Unterlegung des unteren Cellulose-Acetat-Filters mit normalem Filterpapier
b) Kultivierung ohne Abdeckung der Wurzeln mit einem zweiten Cellulose-Acetat-Filter
c) Kultivierung in kleineren Petrischalen (Ø 10cm)
d) Kultivierung in großen Glas-Petrischalen (Ø 20cm), wie in der Arbeit von Müller (1995) beschrieben

Die Dünnschichtchromatographie wurde als HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatographie) durchgeführt. Die hierzu verwendeten Nano-Platten waren mit extrem feinem Kieselgel beschichtet, das einen Fluoreszenzindikator enthielt (Nano-Platten SIL-20 UV₂₅₄, Schichtdicke 0,2mm; Machery & Nagel, Düren). Die feine Körnung des Kieselgels ermöglicht eine besonders gute Auftrennung der Substanzen bei kleinen Probenvolumina. Es wurden jeweils 3µl Probenvolumen mit Hilfe einer geeichten Kapillare (Hirschmann Laborgeräte, Deutschland) aufgetragen.

Die chromatographische Auftrennung erfolgte, wie in Tab. 2.4 beschrieben, eindimensional.

Tab. 2.4 Laufbedingungen bei der HPTLC zur Trennung phenolischer Substanzen im Wurzelexsudat der Gurke.

Parameter des HPTLC-Laufes	Charakteristik
HPTLC-Platten:	Nano-SIL 20 UV ₂₅₄ , Schichtdicke 0,2mm
Probenvolumen:	3µl
Laufmittel:	Chloroform : MeOH : Formiat 93 : 6 : 1
Dauer der Kammersättigung:	20min
Inkubation:	20min bei 28°C

Das Laufmittel wurde vor Durchführung der Chromatographie frisch angesetzt und ein Teil davon in die mit Filterpapier ausgekleidete Chromatographie-Kammer gegeben, wodurch nach 20min eine Kammersättigung erreicht wurde. Der eigentliche Lauf erfolgte in einem Wärmeschränk bei 28°C für 20min. Die Laufmittelfront wurde direkt nach Entnahme der Platten aus der Chromatographie-Kammer zur späteren Bestimmung der R_F-Werte¹¹ (siehe Kap.3.6.1) der aufgetrennten Substanzen markiert.

Die aufgetrennten Substanzen wurden in zwei Schritten einer UV-spektroskopischen Analyse unterzogen:

¹¹ siehe Kap. 3.6.1.

1. Bestimmung der Eigenfluoreszenz mit Hilfe einer UV-Lampe (Desaga, Heidelberg): Bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 254nm sind die aufgetrennten Substanz auf der durch den Indikator gelb fluoreszierenden Platte als dunkle Spots zu erkennen. Durch die Anwendung von Licht der Wellenlänge 366nm zeigen die Substanz-Spots farbige Eigenfluoreszenzen.

2. Bestimmung der UV-Absorptionsspektren: Durch Verwendung eines Densitometers (CD 600, Dasaga, Heidelberg) konnten die Spektren direkt von den Substanz-Spots auf der Nano-Platte aufgenommen werden. Die erhaltenen UV-Spektren wurden mit Spektren von Standardlösungen und mit aus der Literatur (Harborne and Swain, 1969; Harborne, 1988; Herz et al., 1983, Mabry et al. 1970, Markham, 1982, D'Acry Lameta, 1986) bekannten verglichen.

2.11.3.2 HPLC/UV-Spektroskopie

Die getrockneten Wurzelexsudatextrakte wurden für die HPLC-Analyse in je 40µl MeOH gelöst. 10µl dieser Lösung wurde jeweils zur Analyse verwendet, die mittels einer LKB-Anlage mit einem variablen Wellenlängen-Detektor durchgeführt wurde. Zur Trennung der Substanzgemische in den verschiedenen Proben wurde eine ODS-HYPERSIL-Säule (250 × 4mm; Durchmesser 5µm) der Firma Hewlett Packard (Böblingen) eingesetzt. Die Parameter für die Durchführung der Probenanalyse sind in Tab. 2.5 aufgeführt.

Zur qualitativen Analyse wurden die Spektren der Peaks in einem Dioden-Array-Detektor (DAD) gemessen und mit bekannten Flavonoid-Spektren aus der laboreigenen Flavonoid-Datenbank und aus der Literatur (siehe oben) verglichen. In jedem Fall wurden die Wellenlängen der maximalen Absorption in den Spektren bestimmt. Steuerung und Auswertung erfolgte mit einem Softwareprogramm (Spectra SYSTEMTM, Version 2.1) der Firma Spectra-Physics Analytical, Inc. (USA).

Tab. 2.5 Laufbedingungen bei der HPLC zur Trennung phenolischer Wurzelexsudat-Inhaltsstoffe von *Cucumis sativus*.

Parameter des HPLC-Laufes	Charakteristik
HPLC-Gerät:	LKB (Bromma, Schweden; Pump 2150, Variable Wavelength Monitor 2151, Controller 2152, Solvent Conditioner 2156)
Säule:	ODS-HYPERSIL (250 x 4mm, Durchmesser 5µm, Hewlett Packard, Böblingen)
Injektionsvolumen:	10µl
Detektion:	Dioden-Array-Detektor (Spektra Focus Thermoseparation Products, USA)
Mobile Phase (binär):	Acetonitril/H ₂ O (pH 3,3)

Flußrate:	1ml/min
Gradientenelution A:	Anstieg in 25min von 10% auf 55% Acetonitril, 3min bei 55% Acetonitril. Anschließend Waschen der Säule durch Anstieg auf 100% Acetonitril für 6min und Rückkehr auf 10% Acetonitril.
Gradientenelution B:	Anstieg in 25min von 30% auf 60% Acetonitril, 3min bei 60% Acetonitril. Anschließend Waschen der Säule durch Anstieg auf 100% Acetonitril für 6min und Rückkehr auf 10% Acetonitril.

2.12 Einsatz von Flavonoiden im System *Cucumis sativus* / *Pythium ultimum* / *Pseudomonas fluorescens* W34

Es wurden sechs Verbindungen aus vier verschiedenen Untergruppen der Flavonoide und auch zwei Glycoside ausgewählt, um ihre Wirkung als Zusatzsubstanzen in dem in dieser Arbeit entwickelten Pflanzen-Antagonisten-Pathogen-Testsystem zu untersuchen. Die molekulare Struktur dieser Substanzen leitet sich von einer gemeinsamen Molekülstruktur, dem Flavan-Grundgerüst (Abb. 2.2) ab. Einen Überblick über die verwendeten Verbindungen gibt Abb. 2.3. Zum Einsatz im Gewächshaus wurde zunächst von jeder Verbindung eine 1mM Stammlösung hergestellt. Aus dieser wurde je nach gewünschter Konzentration der Substanz im Boden jeweils eine adäquate Menge zur wässrigen *Pythium*-Inokulum-Suspension (siehe Kap. 2.9.5.1) gegeben und vollständig mit dem Bodensubstrat vermischt. Als Kontrolle dienten Zugaben dieser Substanzen ohne *Pythium*-Suspension, einerseits mit bakterisierten Samen und andererseits mit unbehandelten Samen. Jede Substanz wurde in drei verschiedenen Konzentrationen im mikromolaren Bereich eingesetzt: 1µM, 10µM und 30µM pro Bodenlösung. Exemplarisch wurden diese Untersuchungen mit dem Bakterienisolat *Pseudomonas fluorescens* W34 durchgeführt.

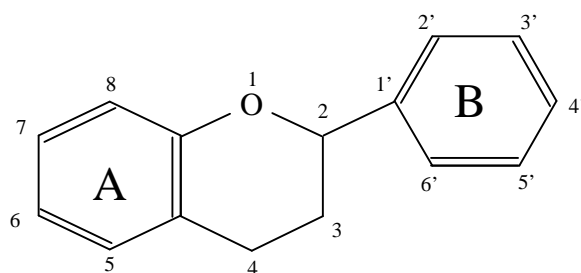
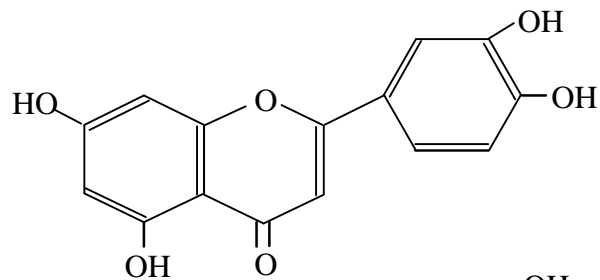


Abb. 2.2 Aufbau des Flavan-Grundgerüsts.

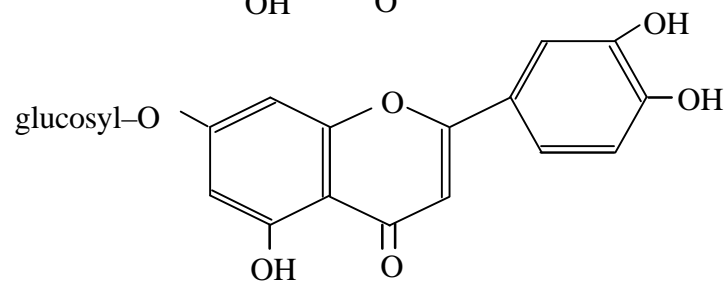
Name

Strukturformel

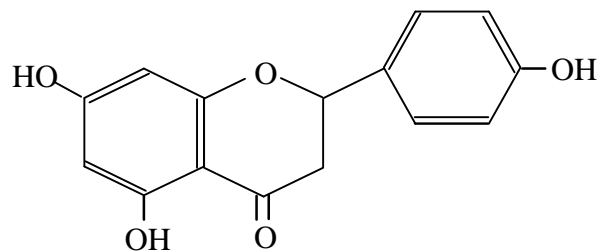
Luteolin (Flavon)



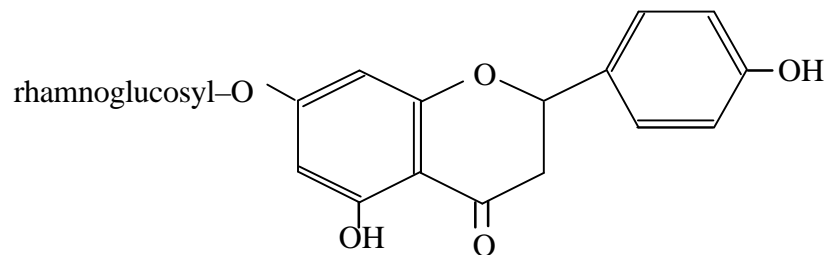
Luteolin-7-
Glucosid
(Flavon-Glucosid)



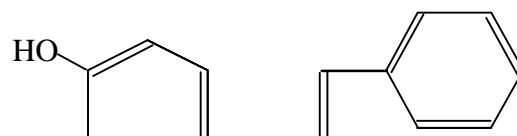
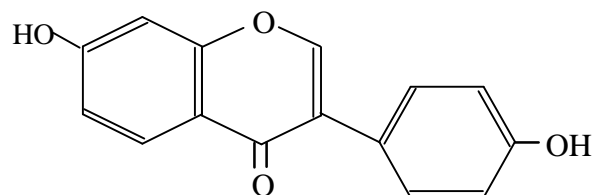
Naringenin
(Flavanon)



Naringin
(Flavanon-
Rhamnoglucosid)



Daidzein
(Isoflavon)



4'-Hydroxy-
Chalkon
(Chalkon)

Abb. 2.3 Strukturformeln und Gruppenzugehörigkeit der verwendeten Flavonoid-Verbindungen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der fluoreszierenden Pseudomonaden

3.1.1 Muster der C-Quellen-Verwertung nach BIOLOG™

Bakterien, die als Antagonisten von Schädlingen in der Rhizosphäre von Pflanzen wirken, können oft ein breites Spektrum von Substraten verwerten, was ihrer Vermehrung und Etablierung am Wirkort dienlich ist. Durch die Verwendung des BIOLOG™-Systems wurden die drei in Hohenheim isolierten Bakterien-Isolate *Pseudomonas fluorescens* W5, W24 und W34 deshalb auf ihre Fähigkeit, bestimmte C-Quellen verwerten zu können, untersucht und differenziert. Durch die Bestimmung des „SIM“-Indexes konnten die Isolate bestimmten Typengruppen der systeminternen Datenbank zugeordnet werden.

Das Isolat *Pseudomonas fluorescens* W24 und das Isolat *Pseudomonas fluorescens* W34 zeigten nahezu identische Verwertungsmuster (Tab. 3.1). Einziger Unterschied der beiden Stämme war die Fähigkeit, Glycyl-L-Glutamat zu oxidieren. *Pseudomonas fluorescens* W34 kann dieses Substrat im Gegensatz zu *Pseudomonas fluorescens* W24 nicht umsetzen. Insgesamt konnten beide Isolate aber mehr als die Hälfte (*Pseudomonas fluorescens* W24: 58%; *Pseudomonas fluorescens* W34: 57%) aller angebotenen C-Quellen verwerten. Beide wurden aufgrund ihrer Ähnlichkeitsindices beim Datenbankvergleich der Biolog-Typengruppe *P. fluorescens* C zugeordnet. Der „SIM“-Index von *Pseudomonas fluorescens* W34 für diese Typengruppe hatte einen Wert von 0,771, der „SIM“-Index von *Pseudomonas fluorescens* W24 lag bei 0,710.

Das C-Quellen-Verwertungsmuster des Isolates *Pseudomonas fluorescens* W5 wies deutliche Unterschiede zu den Mustern der beiden anderen Isolate auf. Insgesamt konnte *Pseudomonas fluorescens* W5 weniger Substrate verwerten (51%). Folgende Substrate dienten *Pseudomonas fluorescens* W5, nicht aber *Pseudomonas fluorescens* W24 und *Pseudomonas fluorescens* W34 als C-Quelle: L-Arabinose, D-Galactose, D-Sorbitol, D-Galactonsäurelacton, D-Galacturonsäure, D-Glucosaminsäure, D-Glucuronsäure und D-Saccharinsäure. Einige Substrate wurden, im Gegensatz zu den anderen beiden Isolaten, von *Pseudomonas fluorescens* W5 nicht verwertet: N-Acetyl-D-Glucosamin, p-Hydroxyphenylacetat, Itaconitat, α -Ketovalerat, Sebacinsäure, Phenylethylamin und Glucose-6-Phosphat.

Tab. 3.1 C-Quellen-Verwertungsmuster der *Pseudomonas fluorescens*-Isolate W5, W24 und W34 nach 24h Inkubation („+“ eindeutige Quellenverwertung, „/“ nicht eindeutige Quellenverwertung, „-“ keine Quellenverwertung).

Substrat	<i>P. fluorescens</i> W34	<i>P. fluorescens</i> W24	<i>P. fluorescens</i> W5
α-Cyclodextrin	-	-	-
Dextrin	-	-	-
Glycogen	-	-	-
Tween 40	+	+	+
Tween 80	+	+	+
N-Acetyl-D-Galactosamin	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamin	+	+	-
Adonitol	-	-	-
L-Arabinose	-	-	+
D-Arabitol	+	+	+
Cellobiose	-	-	-
L-Erythriol	-	-	-
D-Fructose	+	+	+
L-Fucose	-	-	-
D-Galactose	-	-	+
Gentobiose	-	-	-
α-D-Glucose	+	+	+
m-Inositol	+	+	+
α-D-Lactose	-	-	-
Lactulose	-	-	-
Maltose	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+
D-Mannose	+	+	+
D-Melibiose	-	-	-
β-Methyl-D-Glucosid	-	-	-
D-Psicose	-	-	/
D-Raffinose	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	+
Sucrose	-	-	/
D-Trehalose	+	+	+
Turanose	-	-	-
Xylitol	-	-	-
Methylpyruvat	+	+	+
Monomethylsuccinat	+	+	+
Acetat	+	+	-
cis-Aconitat	+	+	+
Citrat	+	+	+
Formiat	/	-	/
D-Galactonsäurelacton	-	-	+
D-Galacturonsäure	-	-	+
D-Gluconat	+	+	+
D-Glucosaminsäure	-	-	+
D-Glucuronsäure	-	-	+
α-Hydroxybutyrat	/	-	/
β-Hydroxybutyrat	+	+	+

τ -Hydroxybutyrat	+	+	/
p-Hydroxyphenylacetat	+	+	-
Itaconitat	+	+	-
α -Ketobutytrat	-	-	-
α -Ketoglutarat	+	+	+
α -Ketovalerat	+	+	-
D,L-Lactat	+	+	+
Malonat	+	+	+
Propionat	+	+	+
Quininsäure	+	+	+
D-Saccharinsäure	-	-	+
Sebacinsäure	+	+	-
Succinat	+	+	/
Bromsuccinat	+	+	/
Succinaminsäure	+	+	+
Glucuronamid	-	-	/
Alaninamid	+	+	+
D-Alanin	+	+	+
L-Alanin	+	+	+
L-Alanin-glycin	+	+	+
L-Asparagin	+	+	+
L-Aspartat	+	+	+
L-Glutamat	+	+	+
Glycyl-L-Aspartat	-	-	-
Glycyl-L-Glutamat	-	+	/
L-Histidin	+	+	/
Hydroxy-L-Prolin	+	+	+
L-Leucin	+	+	+
L-Ornithin	+	+	/
L-Phenylalanin	-	-	/
L-Prolin	+	+	+
L-Pyroglutamat	+	+	+
D-Serin	/	/	/
L-Serin	+	+	+
L-Threonin	/	-	+
D,L-Carnitin	+	+	/
τ -Aminobutytrat	+	+	+
Urocanat	+	+	+
Inosin	+	+	+
Undin	+	+	+
Thymidin	-	-	-
Phenylethylamin	+	+	-
Putrescin	+	+	+
2-Aminoethanol	+	+	+
2,3-Butandiol	-	-	-
Glycerol	+	+	+
D,L- α -Glycerol-Phosphat	/	/	-
Glucose-1-Phosphat	-	-	-
Glucose-6-Phosphat	+	+	-

Nach einem Vergleich mit der BIOLOG-Datenbank konnte das Isolat *Pseudomonas fluorescens* W5 keiner Typengruppe zugeordnet werden, da die errechneten Ähnlichkeitsindices in jedem Falle kleiner als 0,5 waren. Das Isolat kann jedoch in die Nähe der *Pseudomonas fluorescens* Typ F-Gruppe gestellt werden, da sich mit dieser Gruppe die höchste Übereinstimmung (SIM = 0,441) feststellen ließ.

3.1.2 Hemmwirkung der Pseudomonaden in Dualkulturen mit *Pythium ultimum*

Wie in Kapitel 2.6 beschrieben, wurden die drei *Pseudomonas fluorescens*-Isolate W5, W24 und W34 in Dualkulturtests auf ihre Wirksamkeit gegenüber *Pythium ultimum* in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Nährmedium überprüft. In Tabelle 3.2 sind die Größen der Hemmzonen auf verschiedenen Nährmedien angegeben.

Tab. 3.2 Antagonistische Wirkung von *P. fluorescens* W5, W24 und W34 gegen *Pythium ultimum* auf verschiedenen Nährmedien bei 28°C. Angegeben sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs Ansätzen.

Bakterienisolat	Hemmhofgröße [mm]			
	PDA	TSA	KBA	M9A
<i>P. fluorescens</i> W5	0	0	0	0
<i>P. fluorescens</i> W24	8,5 (±1,3)	16,0 (±1,1)	15,0 (±1,5)	22,0 (±0,4)
<i>P. fluorescens</i> W34	1,5 (±0,5)	18,5 (±0,3)	6,5 (±0,7)	20,0 (±0,9)

Unabhängig von den vier verwendeten Agarmedien (PDA, TSA, KBA und M9A) zeigte das Isolat *P. fluorescens* W5 keine Wirkung gegen den pathogenen Pilz. Dies wird in Abb. 3.1 verdeutlicht, in der exemplarisch eine Dualkultur auf PDA-Agar zu sehen ist.

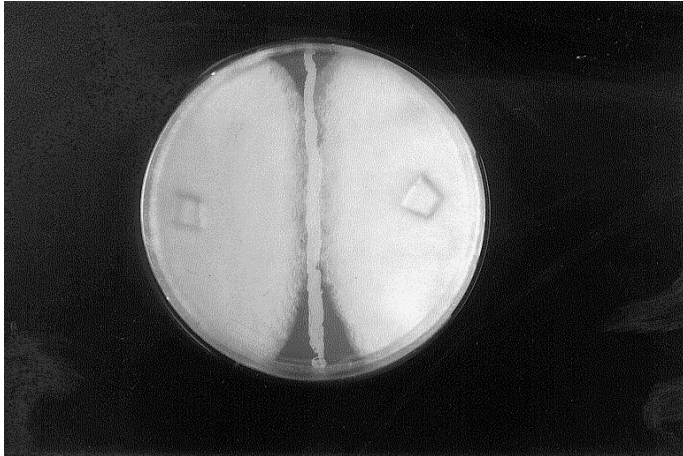


Abb. 3.1 Dualkultur von *Pseudomonas fluorescens* W5 mit *Pythium ultimum* auf einer PDA-Platte.

Erheblich gehemmt wurde der Pilz durch *Pseudomonas fluorescens* W24 und W34 auf M9A-Agar, denn hier zeigten sich bei beiden Bakterien-Isolaten die größten Hemmhöfe von über 20mm bei W34 und 22mm bei W24 (siehe Tab. 3.2). Auch auf TSA-Medium ließ sich bei beiden Isolaten ein starkes antibiotisches Potential gegenüber *P. ultimum* feststellen. Die Hemmhöfe waren hier bei W34 durchschnittlich 18,5mm, bei W24 16mm groß. Auf King B-Agar waren die Hemmaktivitäten von *Pseudomonas fluorescens* W24 und W34 schwächer, aber sehr unterschiedlich ausgeprägt, wie in Abb. 3.2 a und b veranschaulicht wird.

a)



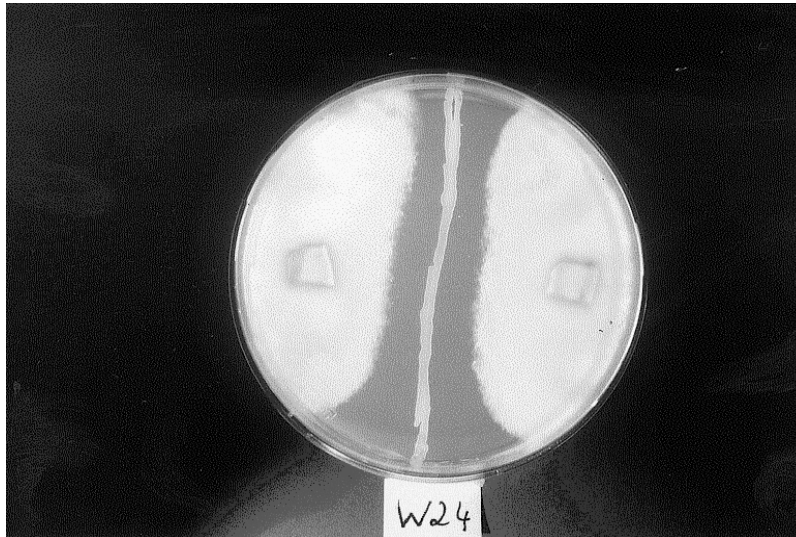
b)



Abb. 3.2a,b Unterschiedlich ausgeprägte Hemmung des Myzelwachstums von *Pythium ultimum* durch die Bakterienisolate *Pseudomonas fluorescens* W24 (a) und W34 (b) auf King B-Agar.

Das dextrosereiche Medium PDA unterdrückte vor allem bei *Pseudomonas fluorescens* W34 die Hemmstoffproduktion, denn es wurden bei den Dualkulturen mit diesem Isolat nur kleine Hemmzonen von durchschnittlich 1,5mm gemessen (Tab. 3.2 und Abb. 3.3b). Auf PDA-Agar wurden von allen getesteten Nährmedien auch bei *Pseudomonas fluorescens* W24 die geringste Hemmwirkung festgestellt (Abb. 3.3a). Die Hemmzone war in diesem Fall durchschnittlich 8,5mm groß (Tab. 3.2).

a)



b)

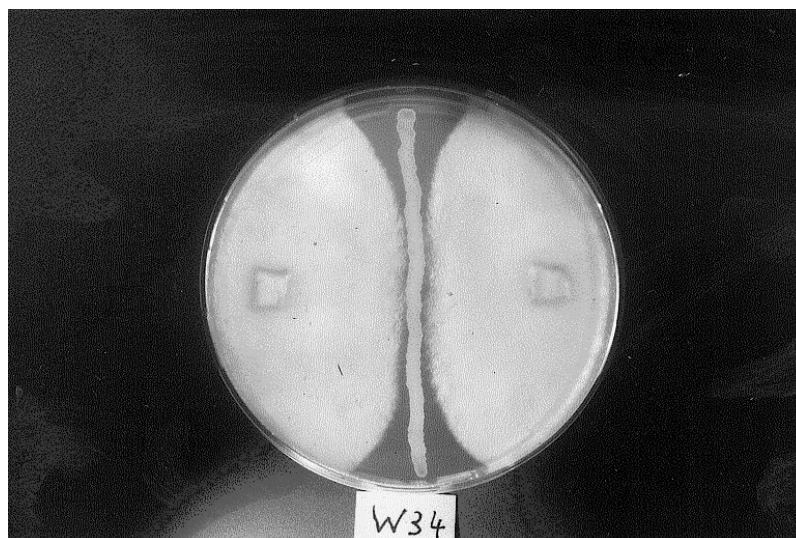


Abb. 3.3a,b Hemmung des Myzelwachstums von *P. ultimum* durch die Bakterienisolate *P. fluorescens* W24 (a) und W34 (b) auf PDA.

3.2 Determination des *Pythium*-Isolates

Das in Hohenheim isolierte und für die Verwendung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellte *Pythium* sp.-Isolat war nicht genauer determiniert. Die Determination des Isolates war aber die Voraussetzung einerseits für die Einstellung adäquater Kultivierungsbedingungen des Pilzes im Labor und andererseits für die Herstellung eines dosierbaren Inokulums für die künstlichen Bodeninokulationen in dem in dieser Arbeit zu entwickelnden standardisierten Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystem. In diesem Testsystem sollten dem pathogenen Pilz außerdem optimale Infektionsbedingungen geboten werden, für deren Einstellung ebenfalls eine genauere Kenntnis des Pilz-Isolates notwendig war.

Das Isolat zeigte bei Wachstum auf Agarmedium (MÖS) bei 28°C ein weißes Myzel, das sich mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von durchschnittlich 28,5mm/Tag strahlenförmig ausbreitete und baumwollartig über die Agaroberfläche erhob.

Für die Produktion von Oosporen und Sporangien zur mikroskopischen Bestimmung wurde der Pilz in Erlenmeyerkolben mit MBÖ-Flüssigmedium bei 28°C angezogen. Die in diesem Medium enthaltenen Sterole stimulieren die Bildung von Fortpflanzungsorganen (Van der Plaats-Nieterink 1981).

3.2.1 Lichtmikroskopisch bestimmbare Charakteristika

Die Haupthyphen des *Pythium*-Isolates wiesen eine Dicke von durchschnittlich 8µm auf. Insgesamt waren die Hyphen reich verzweigt (Abb. 3.4).

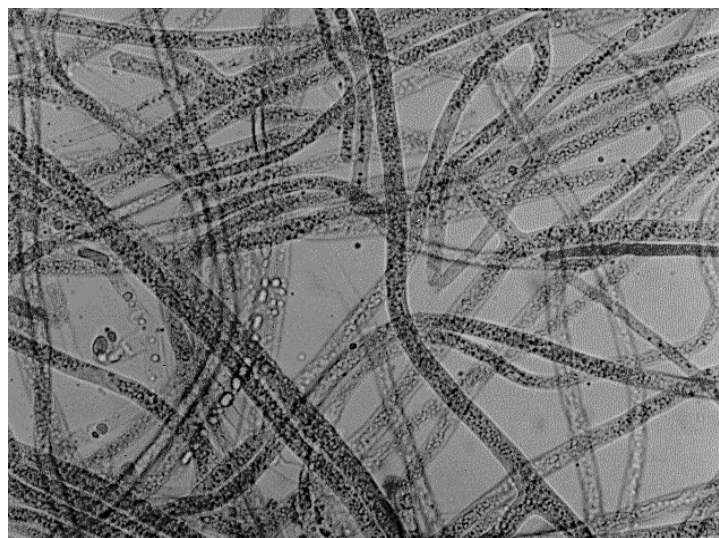


Abb. 3.4 Safraningefärbtes Myzel des *Pythium*-Isolates.

In Abbildung 3.5 sind die kugelförmigen Oosporen des Pilzes zu erkennen. Pro Oogonium ist eine apalerotische¹² Oospore vorhanden. Der Durchmesser einer Oospore betrug durchschnittlich 18µm, die Wandstärke der Oosporen betrug 2µm. Die ebenfalls kugelförmigen Oogonien waren terminal, besaßen eine glatte Wand und hatten einen Durchmesser von durchschnittlich 21µm.

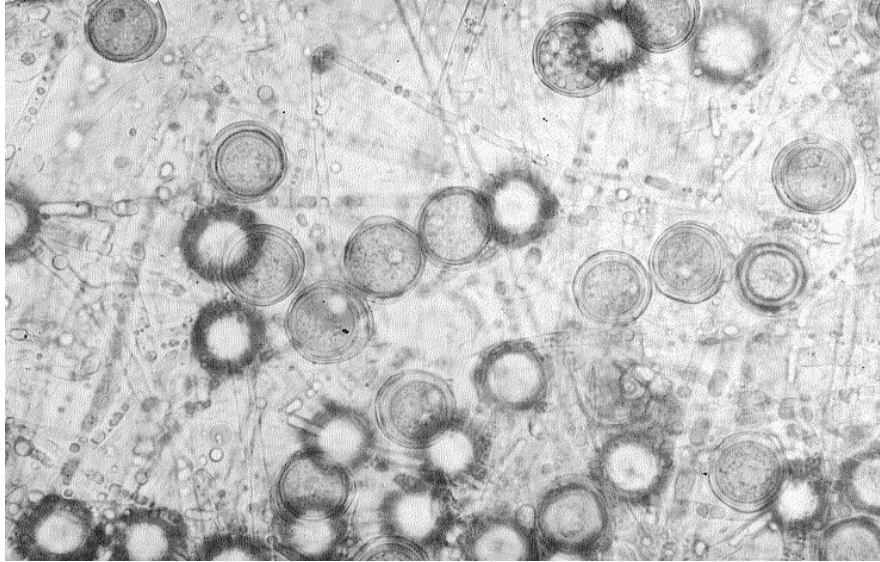


Abb. 3.5 Safraningefärbtes Präparat mit Oosporen und Oogonien des *Pythium*-Isolates.

In allen mikroskopierten Präparaten konnten nur an zwei Stellen Antheridien aufgefunden werden. Diese wiesen eine sackähnliche Form auf und waren hypogyn¹³. Pro Oogonium war jeweils nur ein Antheridium vorhanden (siehe Abb. 3.6).

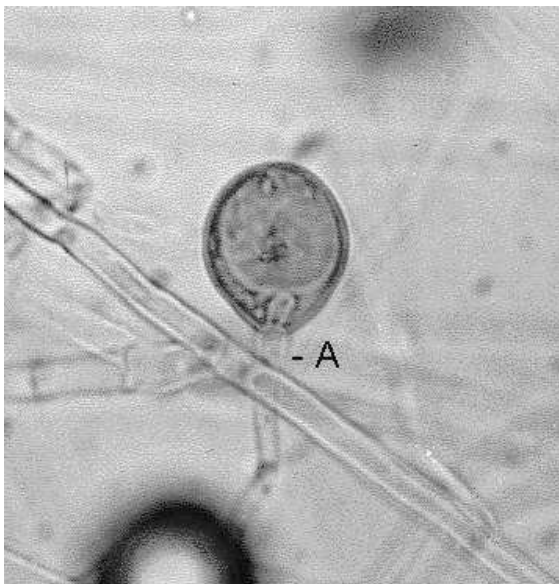


Abb. 3.6 Ungefärbtes Präparat mit einem Antheridium des *Pythium*-Isolates.

¹² Eine apalerotische Oospore füllt das Oogonium nicht ganz aus; zwischen Oogoniumwand und Oosporenwand befindet sich also noch Platz.

¹³ Hypogyne Antheridien befinden sich direkt am Stiel unterhalb der Oogonien.

In den mikroskopierte Präparaten konnten auch immer wieder kugelförmige interkalare und terminale Verdickungen der Hyphen beobachtet werden. Sporangien des Pilzes konnten in keinem der untersuchten Präparate gefunden werden.

Die aus diesen makro- und mikroskopischen Studien gewonnenen Daten stimmen mit den in der Literatur für *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum* angegebenen (Van der Plaats-Niterink 1981) überein. Das für die Versuche in dieser Arbeit zur Verfügung stehende *Pythium*-Isolat konnte also mit Hilfe der Lichtmikroskopie bis zur Varietät genau determiniert werden.

Die Varietät *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum* ist weltweit verbreitet und besitzt ein sehr breites Wirtspflanzenspektrum. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 25-30°C.

3.2.2 RFLPs (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen)

Die Restriktionsfragmentlängen-Analyse der Internal Transcribed Spacers (ITS) der rDNA des zu untersuchenden *Pythium*-Isolates lieferte das in Abbildung 3.7 angegeben Muster.

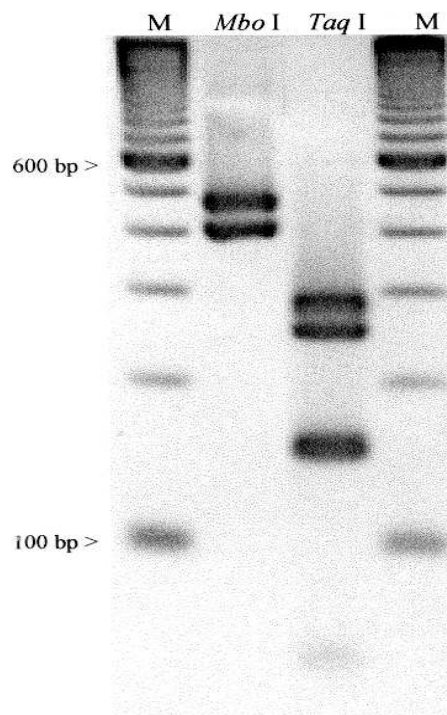


Abb. 3.7 Restriktionsmuster der rDNA Internal Transcribed Spacers (ITS).

Die unter Verwendung der beiden Restriktionsenzyme *TaqI* und *MboI* erhaltenen Fragmentgrößen sind in Tab. 3.3 aufgeführt.

Tab. 3.3 Restriktionsfragmentgrößen der ITS des *Pythium*-Isolates.

rDNA	Restriktionsenzym	ITS-Fragmentgrößen (bp) des <i>Pythium</i> -Isolates
ITS	<i>TaqI</i>	290
		250
		150
		80
	<i>MboI</i>	480
		410

Diese Restriktionsfragmentgrößen der ITS zeigen gute Übereinstimmung mit den aus der Literatur für verschiedene *Pythium*-Arten bekannten, denn Chen et al. (1992) bestimmten die ITS-Fragmentgrößen verschiedener *Pythium*-Arten nach Anwendung des Restriktionsenzymes *TaqI* als 300bp, 250bp, 150bp und 70bp. Durch Anwendung des Restriktionsenzymes *MboI* erhielten sie Fragmentgrößen von 490bp und 420bp. Mit dieser Methode konnte das untersuchte Pilz-Isolat demnach als die Art *Pythium ultimum* bestimmt werden.

3.3 Besiedelung von Gurkensamen und -keimlingswurzeln durch fluoreszierende Pseudomonaden

Um die potentiell antagonistischen Pseudomonaden gezielt an ihren Wirkort – im Falle der Bekämpfung des pathogenen Pilzes *Pythium ultimum* an den Samen und die Keimlingswurzel – zu bringen, wurden einerseits Tauchbehandlungen von Samen bzw. Wurzeln vorgenommen, andererseits wurden die Bakterien auch gemischt mit der Ummantelungssubstanz Gummi Arabicum auf Gurkensaatgut aufgebracht. Diese Applikationsmethoden bieten den Vorteil, mit relativ geringen Aufwandmengen der Bakterien arbeiten zu können, was vor allem in der Praxis des biologischen Pflanzenschutzes von Bedeutung ist. Allerdings ist für die Entfaltung der antagonistischen Wirkung eines Bakteriums das Vorhandensein einer genügend großen Population des Bakteriums von grundlegender Bedeutung. Hierbei spielt die Fähigkeit der Bakterien, an die Wurzel- bzw. Samenoberfläche zu adhären, eine große Rolle. Um Anhaltspunkte über die Effektivität von Samen- und Wurzelbehandlungen mit den in dieser Arbeit verwendeten Pseudomonaden und deren Besiedelungsvermögen zu erhalten, wurden Besiedelungsstudien mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt. Außerdem

wurden durch Rückisolierungsexperimente einerseits das Adhäsionsvermögen der Bakterien direkt nach den Tauchbehandlungen quantifiziert und andererseits das für Antagonisten ebenfalls wichtige Wachstum der Populationen auf den Pflanzenwurzeln verfolgt.

3.3.1 Besiedelung der Samen nach Tauchbehandlung

Um die Effektivität einer fünf Minuten dauernden Tauchbehandlung von Samen und das Adhäsionsvermögen der *Pseudomonas fluorescens*-Isolate W24 und W34 zu überprüfen, wurden, wie in Kap. 2.8 beschrieben, rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Außerdem wurden mit allen für diese Arbeit zur Verfügung stehenden *Pseudomonas*-Isolaten Rückisolierungsexperimente durchgeführt.

3.3.1.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Oberflächen der Gurkensamen, die mit *Pseudomonas fluorescens* W34 ($1,4 \times 10^8$ cfu/ Samen) tauchbehandelt worden waren, zeigten eine dichte Besetzung mit Zellen des Bakteriums (Abb. 3.8).

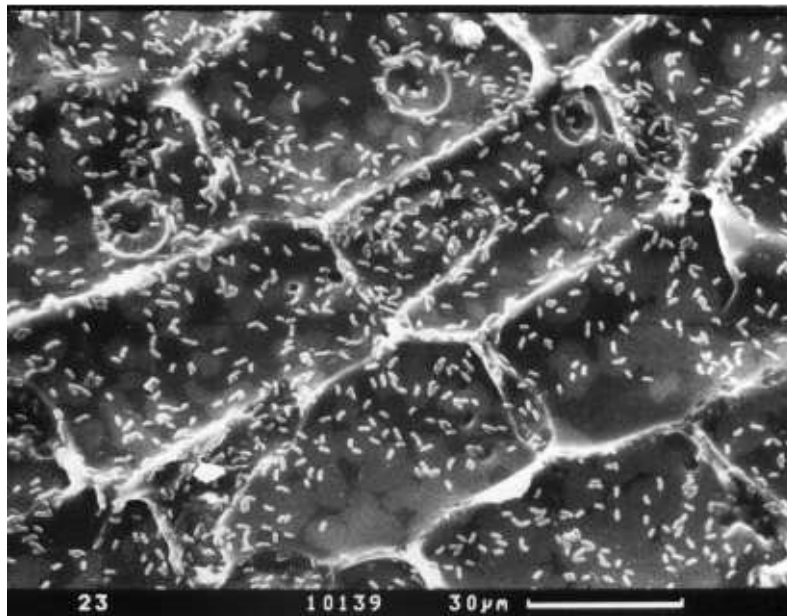


Abb. 3.8 Ausschnitt der Oberfläche eines mit $1,4 \times 10^8$ cfu von *Pseudomonas fluorescens* W34 behandelten Gurkensamens.

Nicht nur die glatten Partien der Samenoberfläche waren gleichmäßig mit *Pseudomonas*-Zellen übersät, sondern auch die Samenhaare waren dicht besiedelt (Abb. 3.9).

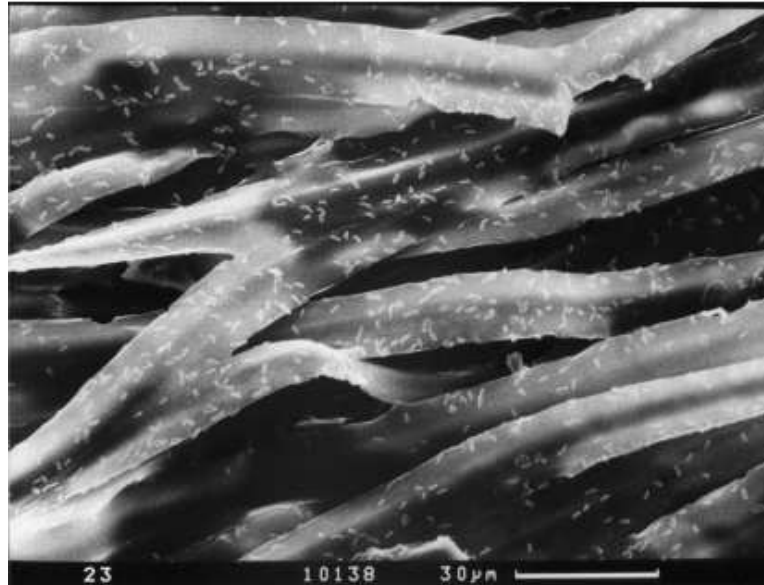


Abb. 3.9 An Samenhaare adhärenzte Zellen von *Pseudomonas fluorescens* W34 nach Tauchbehandlung mit $1,4 \times 10^8$ cfu /Gurkensamen.

Aufgrund des auf den untersuchten Samenoberflächen unregelmäßig ausgeprägten Samenhaarvorkommens und der Unterschiede in der Länge der Samenhaare ließ sich das Verhältnis von Bakterienzahl zur Samenoberfläche allerdings nicht bestimmen.

Wurden Gurkensamen mit dem Isolat *Pseudomonas fluorescens* W24 tauchbehandelt, zeigte sich eine ebenfalls dichte und gleichmäßige Besiedelung der gesamten Samenoberfläche (Abb. 3.10). Die beiden untersuchten *Pseudomonas*-Isolate wiesen demnach ein vergleichbar starkes Adhäsionsvermögen auf.

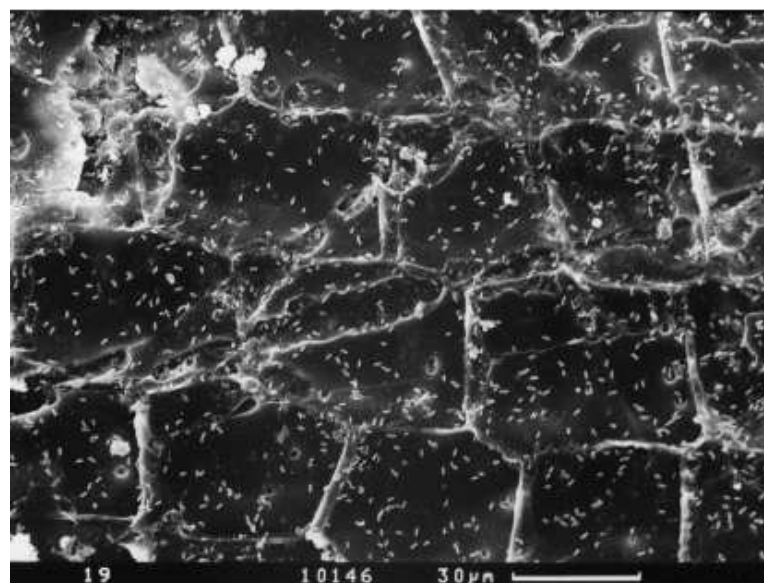


Abb. 3.10 Ausschnitt der Oberfläche eines mit $1,8 \times 10^8$ cfu von *Pseudomonas fluorescens* W24 behandelten Gurkensamens.

3.3.1.2 Rückisolierung der Pseudomonaden von Samenoberflächen

Um die bei einer fünf Minuten dauernden Tauchbehandlung sich an die Samenoberfläche adhärierenden Zellen fünf verschiedener Isolate aus der Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden zu quantifizieren, wurden die Zellen mit Hilfe einer Ultraschallbadbehandlung rückisoliert. Der nach der Applikation und Rückisolierung der verschiedenen *Pseudomonas*-Isolate vorliegende jeweilige Titer ist in Tab. 3.4 angegeben. Bei allen in dieser Untersuchung eingesetzten Stämmen lag er unterhalb des jeweiligen Initialtiters.

Tab. 3.4 Rückisolierungstiter der verschiedenen *Pseudomonas*-Stämme nach 5min dauernder Tauchbehandlung der Samen.

Inokuliertes Bakterienisolat	Initialtiter (cfu/Samen)	Titer der rückisolierten Bakterien (cfu/Samen)
<i>P. fluorescens</i> W5	$3,8 \times 10^9$	$1,1(\pm 0,49) \times 10^7$
<i>P. fluorescens</i> W24	$1,4 \times 10^9$	$8,1(\pm 0,32) \times 10^6$
<i>P. fluorescens</i> W34	$0,9 \times 10^9$	$6,9(\pm 0,88) \times 10^6$
<i>P. chlororaphis</i> I 112	$1,9 \times 10^9$	$0,4(\pm 0,35) \times 10^7$
<i>P. putida</i> II 232	$2,7 \times 10^9$	$1,4(\pm 0,20) \times 10^7$

Bei *Pseudomonas fluorescens* W5, *P. chlororaphis* I 112 und *P. putida* II 232 wurden zwei Zehnerpotenzen weniger Bakterien rückisoliert als ursprünglich eingesetzt wurden, bei *P. fluorescens* W24 und *P. fluorescens* W34 lag der Rückisolierungstiter um zwei bis drei Zehnerpotenzen niedriger als der Initialtiter. Die vergleichbaren Zellzahlen bei den beiden letztgenannten Stämmen korrelieren mit dem Ergebnis der rasterelektronenmikroskopisch sichtbaren, vergleichbar dichten Besiedelung der Samenoberfläche nach der Tauchbehandlung.

3.3.2 Besiedelung der Keimlingswurzeln nach Tauchbehandlung

Das Besiedelungsvermögen der beiden in den Dualkulturtests (Kap. 3.1.2) als antagonistisch gegen *Pythium* eingestuften *Pseudomonas fluorescens*-Isolate W24 und W34 wurde auch nach einer fünf Minuten dauernden Tauchbehandlung der Keimlingswurzel mit Hilfe der REM untersucht. Entsprechend der Angaben in Tab. 2.2 aus Kap. 2.8.2.2 wurden für die Behandlung

mit *P. fluorescens* W34 verschiedene Initialtiter im Bereich von 10^6 und 10^9 cfu/Wurzel gewählt, um zu untersuchen, ob eine Abhängigkeit der Besiedelungsstärke von der Inokulumdichte bestand. Der zur Inokulation mit *P. fluorescens* W24 eingesetzte Titer betrug $1,2 \times 10^8$ cfu/Wurzel. Wiederum wurden auch von allen in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden *Pseudomonas*-Stämmen die Rückisolierungstiter nach Tauchbehandlung der Wurzeln bestimmt.

3.3.2.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Bei der Anwendung eines Titors von 10^8 cfu/Wurzel ließen sich sowohl nach Tauchbehandlung mit *P. fluorescens* W34 als auch mit *P. fluorescens* W24 jeweils eine gleichmäßig dichte Besiedelung der gesamten Rhizoplane feststellen (Abb. 3.11 und 3.12). Auch die Wurzelhaare waren übersät mit Bakterienzellen. Nur direkt an der Wurzelspitze konnte in beiden Fällen keine Besiedelung festgestellt werden.

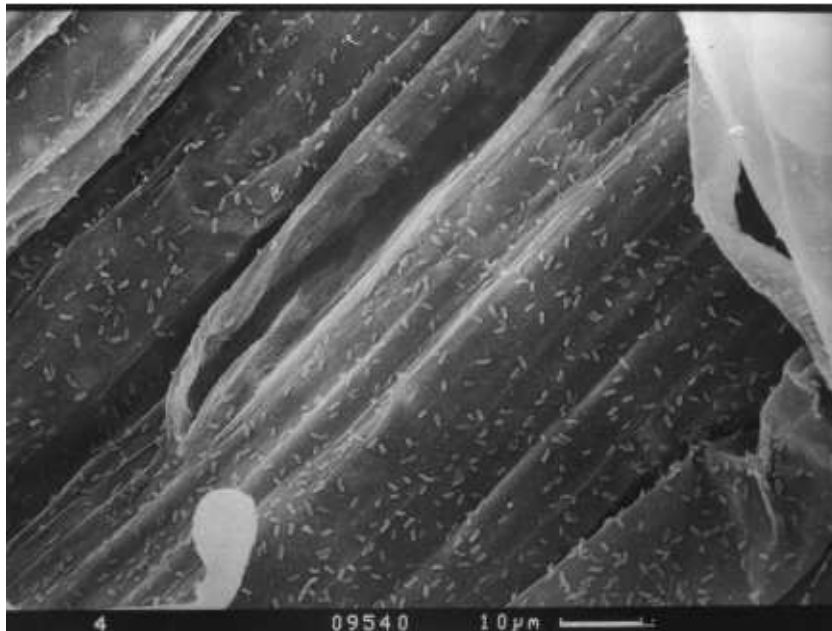


Abb. 3.11 Bakterienrasen auf der Epidermis einer mit $1,3 \times 10^8$ *Pseudomonas fluorescens* W34-Zellen tauchbehandelten Gurkenkeimlingswurzel.

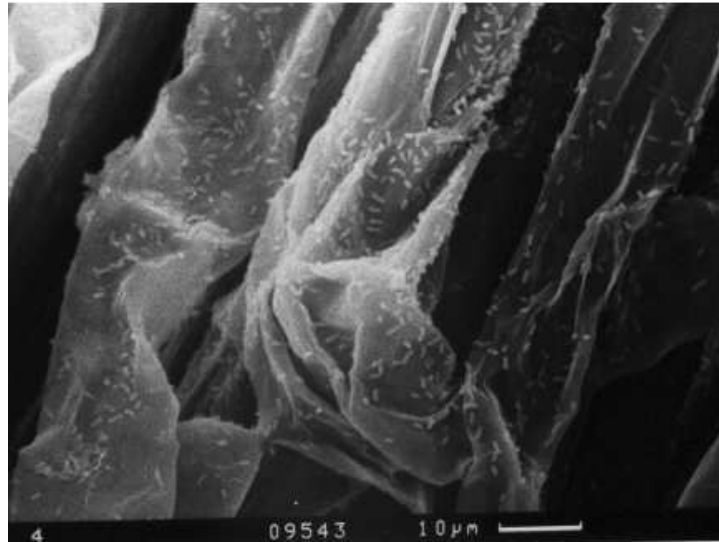


Abb.3.12 Zellen des *Pseudomonas fluorescens*-Isolates W24 auf der Wurzeloberfläche nach Tauchbehandlung mit $1,2 \times 10^8$ cfu/Wurzel (Wurzelhaarbereich).

3.3.2.2 Einfluß von Inokulumdichte auf die Besiedelungsstärke von *P. fluorescens* W34

Bei einem Inokulationstiter von 10^9 cfu/Wurzel war keine dichtere Besetzung der Wurzel-epidermis durch *P. fluorescens* W34 zu beobachten als bei einem Inokulationstiter von 10^8 cfu/Wurzel. Mit der Abnahme des Inokulumtiters bis 10^7 cfu/Wurzel nahm allerdings auch die Dichte der Zellen von *P. fluorescens* W34 auf der Oberfläche der Gurkenkeimlingswurzel ab, die Besiedelung war dennoch gleichmäßig und nicht auf bestimmte Regionen beschränkt (Abb. 3.13). Bei Behandlung der Wurzeln mit 10^6 cfu/Wurzel konnten auf der gesamten Wurzeloberfläche nur noch vereinzelt Bakterienzellen beobachtet werden.

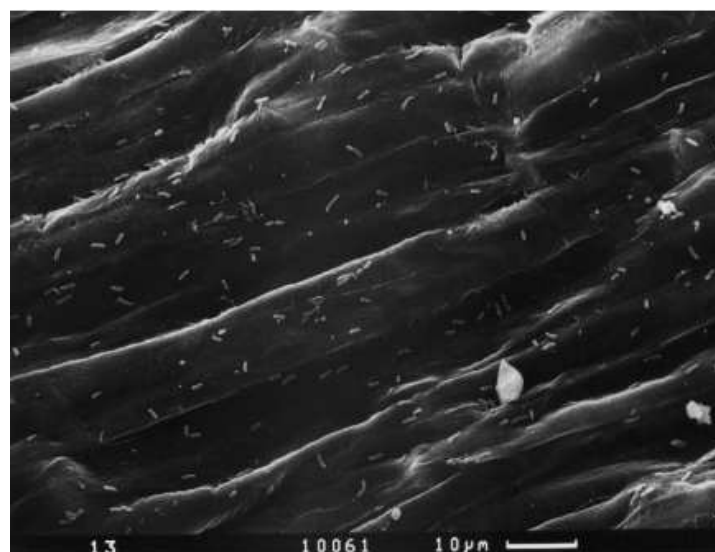


Abb. 3.13 Zellen auf der Oberfläche einer mit *Pseudomonas fluorescens* W34 (10^7 cfu) behandelten Gurkenkeimlingswurzel.

3.3.2.3 Rückisolierung der Pseudomonaden von Wurzeloberflächen

Durch eine Ultraschallbadbehandlung konnten die verschiedenen *Pseudomonaden* nach einer fünf Minuten dauernden Tauchbehandlung der Keimlingswurzeln wieder von deren Oberfläche abgelöst und isoliert werden. Der dann bestimmte Titer ist für die einzelnen Isolate in Tab. 3.5 aufgeführt. Bei den drei *P. fluorescens*-Stämmen und bei *P. putida* II 232 lag dieser Rückisolierungstiter um eine Zehnerpotenz, bei *P. chlororaphis* I 112 um zwei Zehnerpotenzen unterhalb des jeweiligen Initialtiters.

Tab. 3.5 Rückisolierungstiter der verschiedenen *Pseudomonas*-Stämme nach 5min dauernder Tauchbehandlung der Keimlingswurzeln.

Inokuliertes Bakterienisolat	Initialtiter (cfu/Wurzel)	Titer der rückisolierten Bakterien (cfu/Wurzel)
<i>P. fluorescens</i> W34	$1,9 \times 10^8$	$1,7(\pm 0,50) \times 10^7$
<i>P. fluorescens</i> W24	$1,6 \times 10^8$	$1,0(\pm 0,32) \times 10^7$
<i>P. fluorescens</i> W5	$5,6 \times 10^7$	$3,3(\pm 0,15) \times 10^6$
<i>P. chlororaphis</i> I 112	$3,0 \times 10^8$	$4,8(\pm 0,07) \times 10^6$
<i>P. putida</i> II 232	$2,7 \times 10^7$	$1,9(\pm 0,56) \times 10^6$

Ingesamt spiegeln auch hier die Zellzahlen der beiden Isolate *P. fluorescens* W24 und W34 die durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigte dichte Besiedelung der Keimlingswurzel nach Behandlung mit den beiden Stämmen wieder.

3.3.3 Besiedelung der Keimlingswurzeln nach Samenbehandlung

Bei einer Saatgutbehandlung mit potentiellen Antagonisten ist es wesentlich, diesen ein möglichst langes Überleben am Samenkorn zu gewährleisten, da eine sofortige Aussaat nach der Behandlung in der Regel nicht möglich ist. Durch ein Inkrustierungsverfahren wurde das Saatgut deshalb mit Gummi Arabicum ummantelt, in dem sich auch Bakterien befanden, die somit vor Austrocknung geschützt waren. Nach Trocknung der Samen unter einem starken, sterilen Luftstrom bei Raumtemperatur und einer anschließenden zweitägigen Keimungsdauer wurde durch Anwendung der Rasterelektronenmikroskopie das Besiedelungsverhalten von

zwei *in vitro* antagonistisch wirkenden Bakterienisolaten dokumentiert. Wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, handelt es sich hierbei um die Isolate *Pseudomonas fluorescens* W24 und W34. Für die Wirksamkeit von Bakterien gegen Pathogene im Wurzelbereich der Pflanze müssen diese nicht nur auf dem getrockneten Saatgut überleben, sondern die Pflanzenwurzel auch besiedeln können, da nur dadurch ein längerfristiger Schutz vor Pathogenen zu erwarten ist. Um weitere Anhaltspunkte über dieses Besiedlungsvermögen zu erhalten, wurde die Zahl der nach Sameninkrustierung und Keimung von den Keimlingswurzeln rückisolierten Bakterienzellen bestimmt. Zum Vergleich wurde hierbei auch der *in vitro* gegen *Pythium* unwirksame (siehe Kap. 3.1.2) *Pseudomonas*-Stamm W5 eingesetzt.

3.3.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Nach Keimung von mit Bakterien inokulierten Samen konnte nach zwei Tagen eine Besiedelung der Keimlingswurzel festgestellt werden. Vor allem an der Wurzelbasis konnten Ansammlungen von Pseudomonaden beobachtet werden (siehe Abb. 3.14 und 3.15). Mit Ausnahme des Wurzelspitzenbereichs war die gesamte Epidermis mit Bakterienzellen bedeckt. Die Dichte der Einzelzellen und die Häufigkeit der Zellansammlungen nahm in Richtung Wurzelspitze ab. Diese Beobachtungen entsprechen sich bei den beiden *Pseudomonas fluorescens*-Stämmen (W24 und W34).

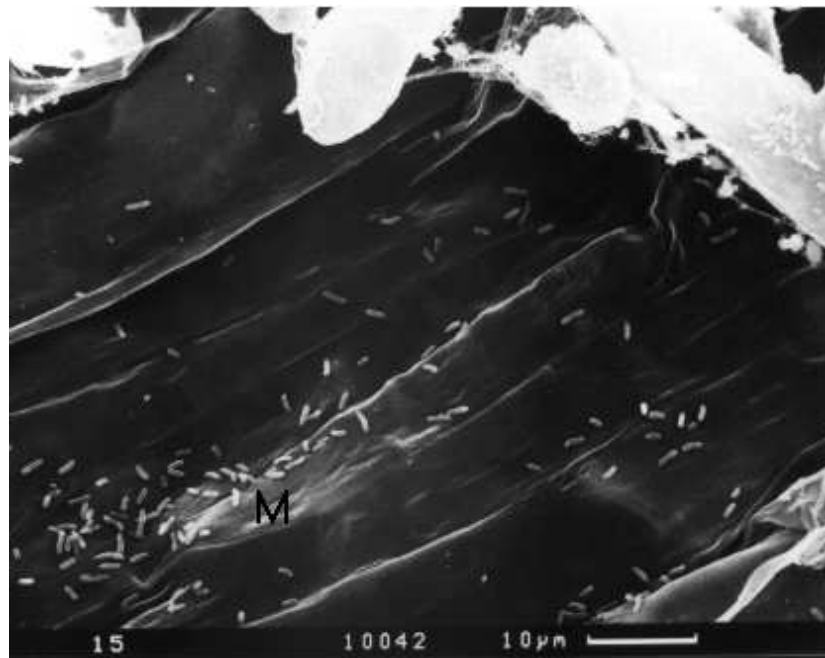


Abb. 3.14 Wurzeloberfläche eines Gurkenkeimlings zwei Tage nach Inokulation mit *P. fluorescens* W24. In der abgebildeten Region, die sich an der Wurzelbasis befindet, sind Ansammlungen von Zellen (Mikrokolonien (M)) zu sehen. Verstreut liegende einzelne *Pseudomonas*-Zellen sind ebenfalls zu erkennen.

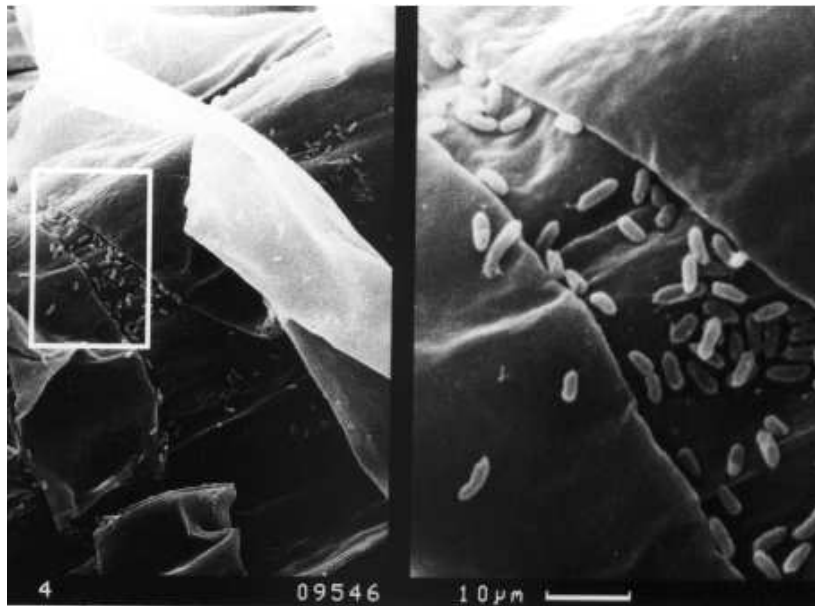


Abb. 3.15 Mikrokolonie von *P. fluorescens* W34 auf der Epidermis einer zwei Tage alten Keimlingswurzel im Bereich der Wurzelbasis. Die vergrößert dargestellte Kolonie erstreckt sich zwischen zwei kollabierten Wurzelhaaren.

Beide Bakterienstämme konnten demnach die Keimlingswurzel vom Samen aus aktiv besiedeln, was bei der Anwendung eines Bakteriums mit potentiell antagonistischer Wirkung im Pflanzen-Pathogen-Test von grundlegender Bedeutung ist.

3.3.3.2 Rückisolierung der Pseudomonaden von Keimlingswurzeln nach Samenbehandlung

Von den aus inkrustierten Samen gekeimten Wurzeln konnten bei einem Initialtiter von $5,2 \times 10^8$ cfu/Samen bei *Pseudomonas fluorescens* W34 nach zwei Tagen $5,6 \times 10^6$ und nach vier Tagen $5,9 \times 10^6$ lebende Zellen pro Wurzelsegment rückisoliert werden. Bei einem vergleichbaren Initialtiter von $6,5 \times 10^8$ cfu/Samen konnten allerdings bei Anwendung von *Pseudomonas fluorescens* W24 nach zwei und vier Tagen im Vergleich mit W34 um je eine Zehnerpotenz mehr Zellen rückisoliert werden (siehe Tab. 3.6). Der bei dieser Untersuchung ebenfalls eingesetzte *Pseudomonas*-Stamm W5 wies mit $3,2 \times 10^5$ cfu/Samen nach zwei Tagen und bzw. $3,8 \times 10^5$ cfu/cm Wurzel nach vier Tagen Keimung die geringsten Rückisolierungstitere auf.

Tab. 3.6 Titer der nach Sameninkrustierung und Keimung von der Wurzel rückisolierten Bakterien.

Inokuliertes Bakterienisolat	Ausgangstiter (cfu/Samen)	Rückisolierungstiter (cfu/cm Wurzel)	
		nach zwei Tagen	nach vier Tagen
<i>P. fluorescens</i> W34	$5,2 \times 10^8$	$5,6(\pm 0,19) \times 10^6$	$5,9(\pm 0,44) \times 10^6$
<i>P. fluorescens</i> W24	$6,5 \times 10^8$	$2,3(\pm 0,35) \times 10^7$	$4,7(\pm 0,56) \times 10^7$
<i>P. fluorescens</i> W5	$2,4 \times 10^8$	$3,2(\pm 0,47) \times 10^5$	$3,8(\pm 0,31) \times 10^5$

Die nach zwei Tagen bestimmten Rückisolierungstiter bestätigen die schon bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung festgestellte aktive Besiedelung der Wurzel durch die beiden Isolate *Pseudomonas fluorescens* W34 und W24. Alle drei Bakterienstämme konnten sich auch auf der wachsenden Wurzel vermehren, wie die Zunahme der Rückisolierungstiter pro Längeneinheit Wurzel im Untersuchungszeitraum zeigte. Am stärksten war das Wachstum der Population bei *Pseudomonas fluorescens* W24, bei dem innerhalb von zwei Tagen eine Titererhöhung um $2,4 \times 10^7$ cfu/cm Wurzel zu bestimmen war.

3.4 Etablierung eines standardisierten Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystems

3.4.1 Effektivität der Samenbehandlung

3.4.1.1 Beurteilung der Samensterilisation

Zur Festlegung einer geeigneten Technik zur Oberflächensterilisation wurden Gurkensamen einerseits mit 30%igem und andererseits mit 15%igem H_2O_2 unterschiedlich lang behandelt und zur Überprüfung der Effektivität dieser Sterilisationsvarianten auf NB-Agarplatten zur Keimung ausgelegt. Nur Gurkensamen, die 10-15 min mit 30% Wasserstoffperoxid behandelt wurden,

waren bei diesen Keimungsversuchen auf Agar auch nach vier Tagen noch zu 97% steril (Tab. 3.7). Eine Behandlung mit 15%igem H_2O_2 war, unabhängig von der Einwirkdauer, unzureichend.

Tab. 3.7 Prozentsatz der sterilen Samen nach unterschiedlicher Behandlung mit H_2O_2 im Verlauf einer viertägigen Keimungsphase auf NB-Agar.

Sterilisationsvarianten		Anteil steriler Gurkensamen (%) nach einer Zeitdauer von			
Sterilisationslösung	Einwirkdauer	24h	48h	72h	96h
30% H_2O_2	1min	84	9	3	0
	5min	97	97	78	64
	10min	100	100	100	97
	15min	100	100	97	97
15% H_2O_2	1min	34	0	0	0
	5min	57	9	0	0
	10min	64	16	0	0
	15min	84	59	50	6

Somit wurde eine zehn Minuten dauernde Behandlung mit 30%igem H_2O_2 für geeignet befunden und bei den in den Gewächshausversuchen verwendeten Gurkensamen zur Oberflächensterilisation eingesetzt. An anderer Stelle (Kap. 3.4.2) wurde auch die Entwicklung der so behandelten Samen im Gewächshaus überprüft.

3.4.1.2 Effektivität der Saatgutinkrustierung mit Pseudomonaden

Um die zu untersuchenden, potentiell antagonistisch wirkenden Bakterien in das komplexe Pflanzen-Pathogen-System in geeigneter Menge und möglichst nahe an ihrem Wirkort einzubringen, wurde die schon bei den Besiedelungsstudien angewendete Inkrustierungstechnik

zur Behandlung größerer Samenmengen ausgeweitet. Die Samen wurden, wie in Kap. 2.9.1.2 beschrieben, portionsweise (je 100 Stück) 45min mit Bakteriensuspensionen, gemischt mit Gummi Arabicum, inkrustiert. Durch Rückisolierung der verschiedenen Pseudomonaden konnten Anhaltspunkte über die Effektivität dieser Samenbehandlung erhalten werden, deshalb wurde jeweils nach Inkrustierung größerer Mengen von Gurkensamen mit den verschiedenen Pseudomonaden der Titer der auf den Samenoberflächen nach Trocknung vorhandenen Bakterien bestimmt. Die Titer wurden verglichen mit den nach parallel durchgeführten Einzelbehandlungen erhaltenen. In allen Fällen konnte ein Bakterinokulum zwischen 10^6 und 10^7 cfu pro Samen nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.8).

Tab. 3.8 Rückisolierung der verschiedenen Pseudomonaden nach Inkrustierung einzelner Samen (a) und nach Inkrustierung von je 100 Samen (b).

Inokuliertes Bakterienisolat	Initialtiter (cfu/ml)	Titer der rückisolierten Bakterien (cfu/Samen)	
		a	b
<i>P. fluorescens</i> W5	$1,3 \times 10^9$	$1,8(\pm 0,4) \times 10^7$	$7,2(\pm 0,3) \times 10^6$
<i>P. fluorescens</i> W24	$1,1 \times 10^9$	$6,4(\pm 0,6) \times 10^7$	$1,0(\pm 0,2) \times 10^7$
<i>P. fluorescens</i> W34	$1,2 \times 10^9$	$5,6(\pm 1,4) \times 10^6$	$2,3(\pm 0,5) \times 10^7$
<i>P. chlororaphis</i> I 112	$2,3 \times 10^9$	$2,8(\pm 0,2) \times 10^7$	$1,4(\pm 0,1) \times 10^7$
<i>P. putida</i> II 232	$1,8 \times 10^9$	$7,9(\pm 1,7) \times 10^7$	$3,7(\pm 0,3) \times 10^6$

Die Effektivität der Behandlung größerer Mengen von Samen war vergleichbar mit derjenigen von Einzelbehandlungen. Durch die Anwendung dieser Inkrustierungsmethode für größere Samenmengen war demnach pro Samen ein genügend hohes Bakterieninokulum gewährleistet und somit die Voraussetzung für eine Etablierung der Bakterien im Pflanzen-Pathogen-System geschaffen.

3.4.2 Saatgutkeimfähigkeit von *Cucumis sativus* L.

Für den Einsatz von unterschiedlich behandeltem Saatgut im Gewächshaustest mit *Pythium ultimum* mußte ausgeschlossen werden, daß schon eine möglicherweise schlechte Keimfähigkeit von Samen zu erniedrigten Auflaufraten führt. Ist dies der Fall, so kann der allein durch das Pathogen erzeugte Effekt des Pre-Emergence-Damping-off, bei dem die Pflanzen ebenfalls nicht auflaufen, bei den Bonituren der Auflaufraten nicht mehr differenziert werden. Auch für die Quantifizierung des anatoginistischen Potentials der Pseudomonaden (Kap. 3.5.2) mußte eine durch die Inkrustierung von Samen mit Bakterien beeinträchtigte Keimungsrate im Vorfeld ausgeschlossen werden.

Die nach sieben Tagen höchste Keimungsrate von 99% erreichte unbehandeltes Saatgut (Tab. 3.9). Steriles Saatgut zeigte eine ebenfalls hohe Keimfähigkeit von 98%. Samen, die mit den verschiedenen *Pseudomonas*-Isolaten inkrustiert waren, keimten auf Wasseragar nach sieben Tagen zu mindestens 93%.

Tab. 3.9 Keimungsraten von unterschiedlich behandelten Gurkensamen nach vier und sieben Tagen Keimungsdauer.

Behandlungsvarianten des Gurkensaatgutes	Keimfähigkeit in % nach einer Zeitdauer von	
	4 d	7 d
unbehandelt	97	99
steril*	94	95
+ <i>P. fluorescens</i> W34	88	98
+ <i>P. fluorescens</i> W24	79	97
+ <i>P. fluorescens</i> W5	83	94
+ <i>P. chlororaphis</i> I 112	81	94
+ <i>P. putida</i> II 232	84	93

*10min mit 30% H₂O₂ behandelt.

Da die Samenkeimung durch keine Behandlung wesentlich beeinträchtigt war, war davon auszugehen, daß entsprechend behandeltes Saatgut für den Einsatz im Gewächshaus geeignet war.

3.4.3 *Pythium*-Infektionstests zur Erzeugung reproduzierbarer Infektionen

Von grundlegender Bedeutung für die Aussagekraft eines Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystems ist die Reproduzierbarkeit von pathogenbedingten Infektionen.

Das Ziel dieser Untersuchung war, eine Methode zur Erzeugung reproduzierbarer Infektionen zu entwickeln, die für die Kontrollen im Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystem verwendet werden konnte. Die Auflaufraten dienten hierzu als leicht meßbarer Parameter zur Beschreibung des jeweiligen pathogenen Potentials bestimmter *Pythium*-Mengen.

Um diejenige *Pythium*-Inokulummenge zu bestimmen, mit der reproduzierbar niedrige Auflaufraten erzeugt werden konnten, wurden in Pflanzentests die Auswirkungen verschiedener *Pythium*-Mengen und unterschiedlicher Zeitspannen zwischen Substratinokulation und Aussaat der Testpflanzen untersucht. Hierzu wurde ein genau dosierbares *Pythium*-Inokulum – bestehend aus Myzel und Fortpflanzungsstrukturen – in Flüssigkultur produziert (Kap. 2.9.5.1) und in den Gewächshausversuchen eingesetzt.

3.4.3.1 Einfluß der *Pythium*-Inokulummenge und der Zeitspanne zwischen Bodeninokulation und Aussaat auf den Befall von *Cucumis sativus* L.

Die Infektionstests wurden mit *Pythium*-Inokulummengen zwischen 0,01 und 0,25g FG/320g Bodensubstrat durchgeführt, wobei auch der Einfluß dreier unterschiedlicher Zeitspannen zwischen Inokulation des Bodens mit *Pythium* und Aussaat der Gurkensamen untersucht wurde.

Zeitspanne 1

Wurden sterile Gurkensamen vier Stunden nach der Inokulation des Bodens mit *Pythium* ausgesät, so lagen die Auflaufraten nach vier Wochen zwischen 2 und 11% (Abb. 3.16). Eine Abhängigkeit der Auflaufraten von der eingesetzten *Pythium*-Inokulummenge wurde nicht festgestellt.

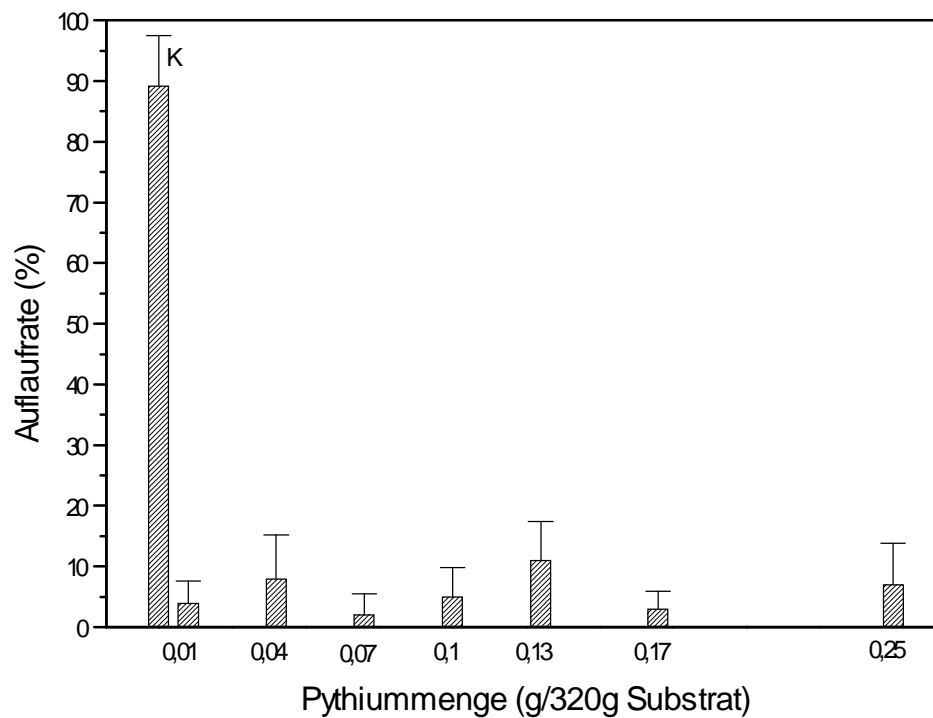


Abb. 3.16 Auflaufraten der Gurken nach Anwendung von Zeitspanne 1 (zwischen Aussaat und Bodeninokulation lagen vier Stunden). K=Kontrolle ohne *Pythium*.

Zeitspanne 2

Lagen zwischen Bodeninokulation mit dem Pathogen und dem Zeitpunkt der Aussaat von Gurkensamen 24 Stunden, so lagen die Auflaufraten, unabhängig von der eingesetzten *Pythium*-Menge, zwischen 0 und 6% (Abb. 3.17).

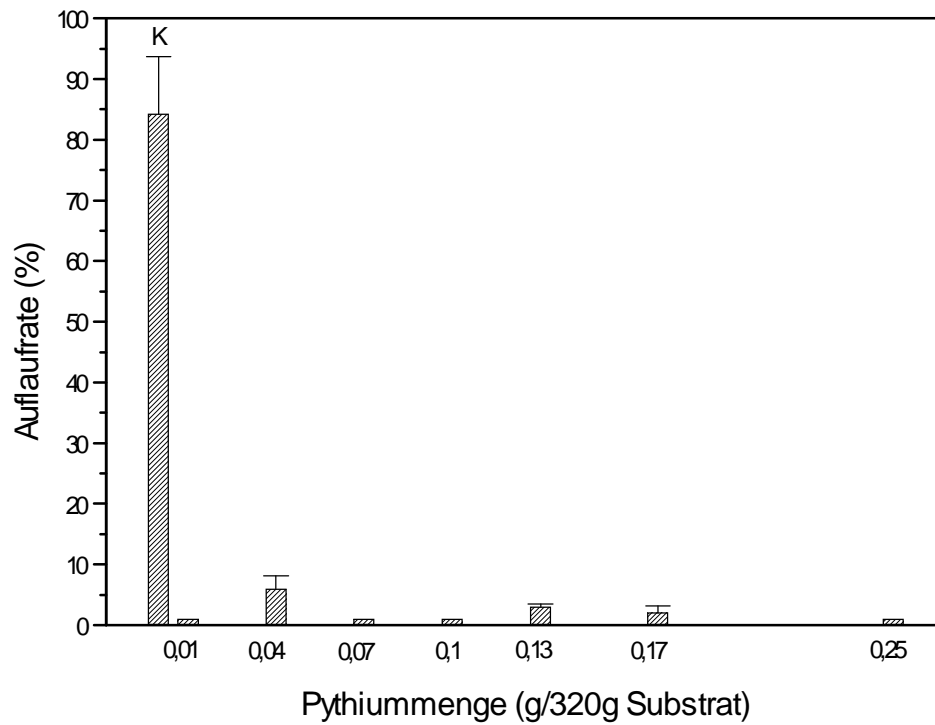


Abb. 3.17 Auflaufraten der Gurken nach Anwendung von Zeitspanne 2 (zwischen Aussaat und Bodeninokulation lagen 24 Stunden). K=Kontrolle ohne *Pythium*.

Zeitspanne 3

Bei gleichzeitiger Inokulation des Substrates mit *Pythium* und der Aussaat der Testpflanzen erzeugten *Pythium*-Mengen von 0,1-0,25g FG/320g Substrat Auflaufraten von weniger als 50%. (siehe Abb. 3.18). Wurden kleinere Mengen des Pathogens eingesetzt, waren die Auflaufraten entsprechend höher.

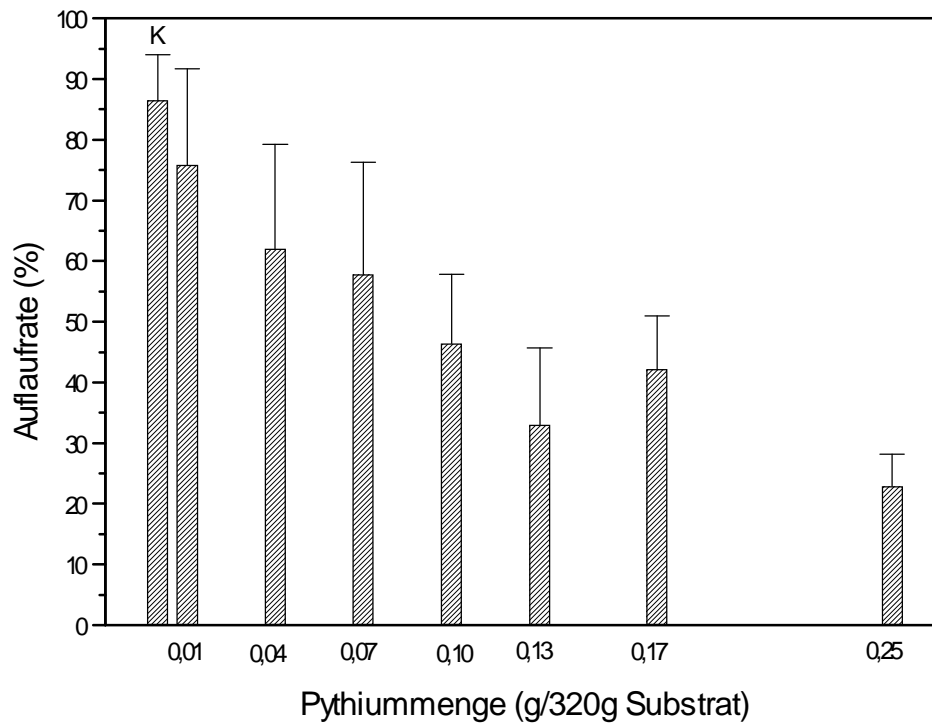


Abb. 3.18 Auflaufraten der Gurken nach Anwendung von Zeitspanne 3 (Aussaat der Samen direkt nach Inokulation des Substrates mit *Pythium*). K=Kontrolle ohne *Pythium*.

Diese Ergebnisse zeigten, daß nur durch eine direkte Aussaat nach Inokulation des Substrates mit *Pythium* eine „Feineinstellung“ der Auflaufraten durch den Einsatz unterschiedlicher Pathogenmengen vorgenommen werden konnte. Die Methoden mit Zeitspanne 1 und Zeitspanne 2 waren für die Anwendung bei den Kontrollen mit Pathogen im zu etablierenden Testsystem nicht geeignet, da in beiden Fällen die erzeugten Auflaufraten zu niedrig waren. Die für Kontrollen geeigneten Auflaufraten sollten bei etwa 20% liegen. Andernfalls muß damit gerechnet werden, daß – unter Betrachtung der Standardabweichungen – bei manchen Wiederholungen keine Keimlinge auflaufen und somit die Auflaufrate als Meßparameter unbrauchbar wird.

Zur Erzeugung der Kontrollen im Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystem wurde demnach folgende Behandlung festgelegt:

Je 320g Bodensubstrat wurden mit 0,25g FG des *Pythium*-Inokulums vollständig vermischt. Direkt im Anschluß daran wurden die Gurkensamen ausgesät. Die durch diese methodischen Standardisierungen erhaltene Auflaufrate der Gurken in mit *Pythium* inokuliertem Boden lag bei durchschnittlich 23% (Abb. 3.18).

3.4.3.2 Inokulumdichten von *Pythium ultimum* nach künstlicher Boden-inokulation

Um im Verlauf der Infektionstests die Entwicklung von *P. ultimum* in künstlich inokuliertem Topfsubstrat verfolgen zu können, wurden die Vermehrungseinheiten des Pathogens aus Bodenproben direkt nach der Bodeninokulation und zwei bzw. vier Wochen später quantifiziert. Die Tabelle 3.10 zeigt die auf dem von Schmitthenner (1979) entwickelten Selektivnähragar SA-PBNC nachgewiesenen Vermehrungseinheiten (VE) pro g Erde nach Inokulation mit 0,25g (FG) von *Pythium ultimum* pro 320g Erde.

Tab. 3.10 *Pythium*-Inokulumdichten im Topfsubstrat (VE pro g luftgetrocknetem Boden) im Verlauf eines Infektionstests mit Gurken.

Zeitpunkt der Probennahme	<i>Pythium</i> -VE/g Topfsubstrat
Tag der Aussaat	1228
14 Tage nach Aussaat	8525
28 Tage nach Aussaat	18798

Nach vier Wochen war die *Pythium*-Inokulumdichte fünfzehnmal so groß wie zum Zeitpunkt der Bodeninokulation, wobei die Vermehrung nicht linear mit der Zeit verlief. Somit war gewährleistet, daß sich das Inokulum unter den eingestellten Versuchsbedingungen weiterentwickeln konnte, was in den Versuchen zur Quantifizierung des antagonistischen Potentials verschiedener Pseudomonaden von grundlegender Bedeutung ist.

3.5 Anwendung des Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystems zur Bestimmung der antagonistischen Wirksamkeit fluoreszierender Pseudomonaden gegen *Pythium ultimum*

Zur Überprüfung der potentiell antagonistischen Mikroorganismen *ad planta* wurde die in Kap. 2.9.5.2 beschriebene Inokulationsmethode für den pathogenen Pilz *P. ultimum* angewendet. Zur Entwicklung des Testsystems und für dessen Anwendung war auch die durchgeführte Optimierung der Saatgutbehandlung unerlässlich. Grundlegend für die Standardisierung des

Systems war andererseits aber auch die schon dargestellte Erzeugung reproduzierbarer Infektionen durch ein genau dosiertes *Pythium ultimum*-Inokulum (0,25g/320g Bodensubstrat) – unter Beachtung einer definierten Zeitspanne zwischen Bodeninokulation mit *Pythium ultimum* und Aussaat der Gurkensamen – und die Festlegung definierter abiotischer Bedingungen im Gewächshaus. Die Quantifizierung des antagonistischen Potentials der verschiedenen Pseudomonaden erfolgte jeweils nach vier Wochen anhand der Auflaufraten. Durch die Erfassung der Wachstumsparameter der Pflanzen konnten außerdem Hinweise auf einen latenten Befall der Pflanzen gewonnen werden.

3.5.1 Auflaufraten und Wachstumsparameter der Kontrollen

Die durch ein *Pythium ultimum*-Inokulum von 0,25g pro 320g Bodensubstrat beeinflussten Auflaufraten der Kontrollen lagen in allen folgenden Versuchen zur Quantifizierung der Wirksamkeit verschiedener Bakterienstämme und zur Wirksamkeitsverbesserung durch Zusatzsubstanzen zwischen 20 und 25% und damit im Bereich der durch die in Abb. 3.18 angegebenen Standardabweichungen. Sie dienten bei der Auswertung aller im folgenden angeführten Gewächshausversuche somit als Ausgangswert, mit dessen Hilfe das antagonistische Potential der Pseudomonaden klar differenziert werden konnte.

In unverseuchtem Bodensubstrat wurden Auflaufraten von durchschnittlich 86% erreicht (Abb. 3.19).



Abb. 3.19 Pflanzenbestand von *Cucumis sativus* L., vier Wochen nach der Aussaat. Links: Gesunde Kontrolle. Rechts: Kontrolle in künstlich mit *P. ultimum* inokuliertem Boden (0,25g/320g Topfsubstrat) mit hoher Pflanzenmortalität.

Das verminderte Wurzeltrockengewicht und die Gesamtbiomasse der Pflanzen aus der inokulierten Kontrolle zu Versuchsende (Tab. 3.11) weisen auf einen latenten Befall der Gurken mit *Pythium ultimum* hin, denn beide Parameter waren im Vergleich zur gesunden Kontrolle signifikant erniedrigt. Bei gleichen Lichtverhältnissen war auch das Längenwachstum der Sprosse aus der inokulierten Kontrolle stark vermindert.

Tab. 3.11 Durchschnittliche Sproßlängen und Sproß-/Wurzeltrockengewichte von Gurkenpflanzen in unbehandeltem Boden und in mit *Pythium* versetztem Boden (Kontrollen).

Kontrollen	Sproßlänge (cm/Pflanze)	Sproß- trockengewicht (g/Pflanze)	Wurzel- trockengewicht (g/Pflanze)	Gesamt- biomasse (g/Pflanze)
– <i>Pythium ultimum</i> (unbehandelter Boden)	13,1(±4,1)	0,56(±0,22)	0,81(±0,32)	1,37(±0,54)
+ <i>Pythium ultimum</i> (0,25g FG/ 320 Bodensubstrat)	8,0(±2,2)*	0,47(±0,15)	0,38(±0,21)*	0,85(±0,35)*

* Signifikant auf 5%-Niveau

3.5.2 Einfluß von Saatgutbehandlungen mit Pseudomonaden auf den Befall von Gurken mit *Pythium ultimum*

In dem in dieser Arbeit entwickelten Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystem wurden die drei *Pseudomonas fluorescens*-Isolate W5, W24 und W34 und zwei weitere Isolate der *Pseudomonas*-Gruppe, *Pseudomonas chlororaphis* I 112 und *Pseudomonas putida* II 232 eingesetzt. Krankheitsvermindernde Effekte dieser fluoreszierenden Pseudomonaden wurden durch die vier Wochen nach der Aussaat des bakterienbehandelten Saatgutes bestimmte Auflafrate der Pflanzen bestimmt. Neben der Anzahl gesund wirkender Pflanzen wurden auch deren Sproßlängen, das Sproß- und Wurzeltrockengewicht und die Gesamtbiomasse erfaßt. Anhand dieser Gewichtsbestimmungen konnten mögliche Wachstumsdepressionen der Pflanzen durch latenten Befall aufgezeigt werden.

Die höchste Auflaufrate von 67% erzeugte das Bakterien-Isolat *Pseudomonas fluorescens* W24 (Abb. 3.20 und Abb. 3.21). Damit konnte für dieses Isolat die schon im Dualkulturtest ohne Pflanzen festgestellte hohe Wirksamkeit, die dort durch große Hemmhöfe angezeigt wurde, *in vivo* bestätigt werden.

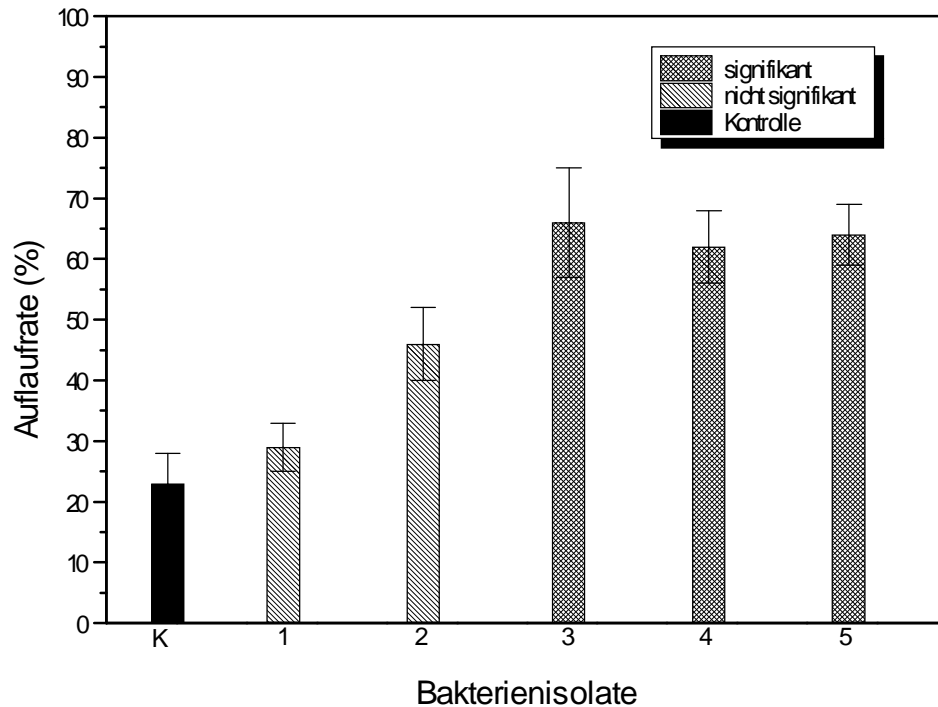


Abb. 3.20 Einfluß von Samenbehandlungen mit *Pseudomonas fluorescens* W34 (1), *Pseudomonas fluorescens* W5 (2), *Pseudomonas fluorescens* W24 (3), *Pseudomonas chlororaphis* I 112 (4) und *Pseudomonas putida* II 232 (5) auf die Auflaufrate von Gurkenkeimlingen in mit *Pythium* (0,25g/320g Substrat) versetztem Boden. Balken, deren Werte sich nach dem χ^2 -Vierfelder-Test signifikant von der Kontrolle ohne Bakterien (K) unterscheiden, sind gekennzeichnet ($p=0,05$).

Auch durch Samenbehandlungen mit den Isolat *Pseudomonas chlororaphis* I 112 und *Ps. putida* II 232 wurden signifikant erhöhte Auflaufraten zwischen 60 und 65% erreicht. Der Einsatz von *Pseudomonas fluorescens* W5 hatte keine signifikant verbesserten Auflaufraten zur Folge. Hiermit wurde die schon in den Dualkulturen dieses Isolates mit dem Pathogen festgestellte, medienunabhängige Unwirksamkeit auch *ad planta* bestätigt. Im Gegensatz dazu verursachte *Pseudomonas fluorescens* W34 zwar in Dualkulturen mit dem Pathogen deutliche Hemmzonen, war aber im Pflanzentest unwirksam.



Abb. 3.21 Einfluß der Saatgutbehandlung mit *P. fluorescens* W24 auf den Befall von Gurken mit *P. ultimum*. Links: mit *Pythium* inokulierte Kontrolle. Rechts: Pflanzenbestand in inokulierter Erde nach Saatgutbehandlung vier Wochen nach der Aussaat.

3.5.3 Einfluß von Saatgutbehandlungen mit Pseudomonaden auf die Wachstumsparameter von Gurken

Die Bestimmung der Wachstumsparameter von Pflanzen, deren Samen mit verschiedenen Pseudomonaden behandelt worden waren, ergab in allen Fällen signifikant erhöhte Sproßlängen (Tab. 3.12). Nur Keimlinge aus Samen, die mit *P. putida* II 232 inokuliert waren zeigten ein im Vergleich zur Kontrolle mit *Pythium* erhöhtes Wurzelgewicht, das aber immer noch niedriger war als in der Kontrolle ohne *Pythium* (Tab. 3.11).

Das Sproßtrockengewicht und die Gesamtbiomasse wurden durch die Samenbehandlungen mit Reinkulturen der *Pseudomonas*-Stämme jeweils nicht beeinflußt.

Tab. 3.12 Durchschnittliche Sproßlängen und Sproß-/Wurzeltrockengewichte von Gurkenpflanzen nach Samenbehandlung mit verschiedenen *Pseudomonas*-Isolaten in mit *Pythium* versetztem Boden.

Inokuliertes Bakterienisolat	Sproßlänge (cm/Pflanze)	Sproß- trockengewicht (g/Pflanze)	Wurzel- trockengewicht (g/Pflanze)	Gesamt- biomasse (g/Pflanze)
+ <i>Pythium</i> (Kontrolle ohne Bakterien)	8,0(±2,2)	0,47(±0,15)	0,38(±0,21)	0,85(±0,35)
<i>Ps. fluorescens</i> W34	12,3(±3,5)*	0,68(±0,25)	0,45(±0,19)	1,13(±0,48)
<i>Ps. fluorescens</i> W5	10,0(±2,0)*	0,41(±0,15)	0,53(±0,17)	0,94(±0,28)
<i>Ps. fluorescens</i> W24	9,7(±2,7)*	0,30(±0,12)	0,36(±0,11)	0,66(±0,21)
<i>Ps. chlororaphis</i> I 112	12,9(±4,9)*	0,53(±0,22)	0,57(±0,16)	1,03(±0,37)
<i>Ps. putida</i> II 232	12,3(±2,8)*	0,52(±0,22)	0,65(±0,16)*	1,17(±0,29)

* Signifikant auf 5%-Niveau

3.5.4 Einfluß von Flavonoidzugaben auf die Wirksamkeit von *Pseudomonas fluorescens* W34

Die Wirkung sechs verschiedener Bodenzusatzsubstanzen aus der Gruppe der Flavonoide im Testsystem wurde beispielhaft in Kombination mit der Anwendung des Isolates *Pseudomonas fluorescens* W34 untersucht, welches, allein eingesetzt, keinen krankheitsmindernden Effekt zeigte (Abb. 3.20). Die Applikation der Substanzen erfolgte einmalig und gleichzeitig mit dem Einmischen der infektiösen Einheiten des Pathogens in das Bodensubstrat. Zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Wirkung dieser Substanzen wurden jeweils drei verschiedene Aufwandmengen (1µM, 10µM und 30µM pro Bodenlösung) getestet.

Die kombinierte Anwendung von *Pseudomonas fluorescens* W34 mit entweder 4'-Hydroxy-Chalkon (30µmol/l), Luteolin-7-Glucosid (10µmol/l) oder Daidzein (30µmol/l) resultierte in signifikant erhöhten Auflaufraten von bis zu 60% (siehe Abb. 3.22a,b).

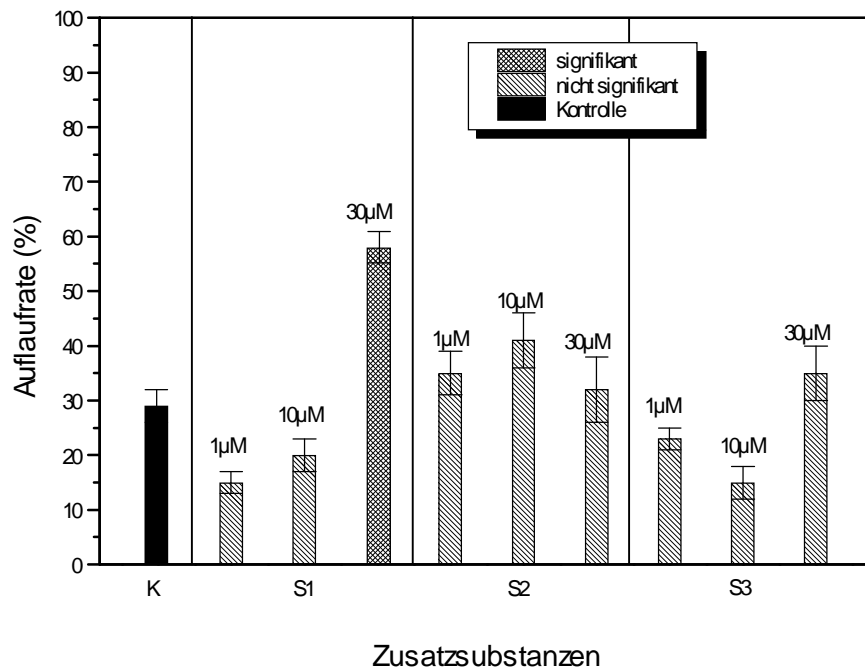


Abb. 3.22a Einfluß von 4'-Hydroxy-Chalkon (S1), Naringenin (S2) und Naringin (S3) auf die Auflauftrate von Gurkenkeimlingen nach Behandlung der Samen mit *Pseudomonas fluorescens* W34.

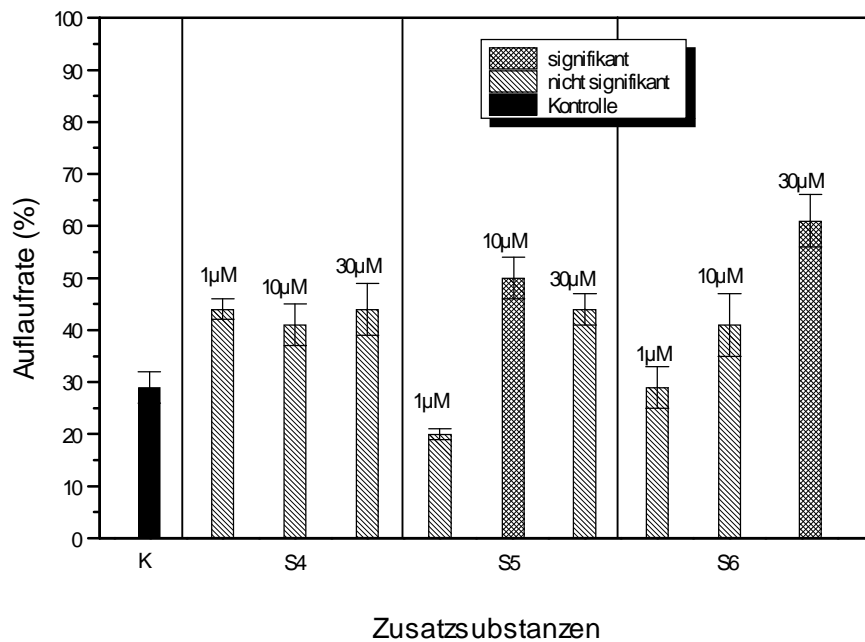


Abb. 3.22b Einfluß von Luteolin (S4), Luteolin-7-Glucosid (S5) und Daidzein (S6) auf die Auflauftrate von Gurkenkeimlingen nach Behandlung der Samen mit *Pseudomonas fluorescens* W34.

Eine positive Beeinflussung der Biomasse und der Sproßlänge der Pflanzen durch die zusätzlichen Bodenbehandlungen mit 4'-Hydroxy-Chalkon (30µmol/l), Luteolin-7-Glucosid (10µmol/l) oder Daidzein (30µmol/l) war nicht festzustellen (Tab. 3.13). Negativ beeinflusst wurde durch diese Behandlungen das Sproßtrockengewicht der Pflanzen.

Tab. 3.13 Durchschnittliche Sproßlängen und Sproß-/Wurzeltrockengewichte von Gurkenpflanzen nach Behandlung mit *Pseudomonas fluorescens* W34 und nach Einbringen von 4'-OH-Chalkon, Luteolin-7-Glucosid und Daidzein in den Boden.

Behandlungsvariante	Sproßlänge (cm/Pflanze)	Sproß- trockengewicht (g/Pflanze)	Wurzel- trockengewicht (g/Pflanze)	Gesamt- biomasse (g/Pflanze)
+ <i>Pythium</i> (Kontrolle)	12,3(±3,5)	0,68(±0,25)	0,45(±0,19)	1,13(±0,48)
+ 4'-OH-Chalkon (30µM/Bodenlösung)	10,3(±2,1)*	0,46(±0,12)*	0,42(±0,23)	0,88(±0,33)
+Luteolin-7-Glucosid (10µM/Bodenlösung)	11,0(±0,27)	0,42(±0,19)*	0,51(±0,22)	0,93(±0,34)
+Daidzein (30µM/Bodenlösung)	14,5(±3,3)	0,57(±0,19)*	0,51(±0,21)	1,08(±0,38)

* Signifikant auf 5%-Niveau.

Wirkung von 4'-Hydroxy-Chalkon, Luteolin-7-glucosid und Daidzein ohne P. fluorescens W34
Kontrollversuche, in denen der Boden zwar entweder mit 4'-Hydroxy-Chalkon (30µmol/l), Luteolin-7-Glucosid (10µmol/l) oder Daidzein (30µmol/l) behandelt wurde, aber gleichzeitig nichtbakterisierte Samen verwendet wurden, zeigten, daß bei Anwendung von Luteolin-7-Glucosid die Auflafrate bei 35%, bei Anwendung von Daidzein bei 40% lag. Beide Substanzen hatten keinen Einfluß auf die Biomasse der Pflanzen (Tab.3.14). Wurde 4'-Hydroxy-Chalkon alleine angewendet, ergaben sich – wie in der mit *P. fluorescens* W34 kombinierten Ausbringung – eine Auflafrate von 60% und außerdem signifikant erhöhte Sproßlängen der Testpflanzen.

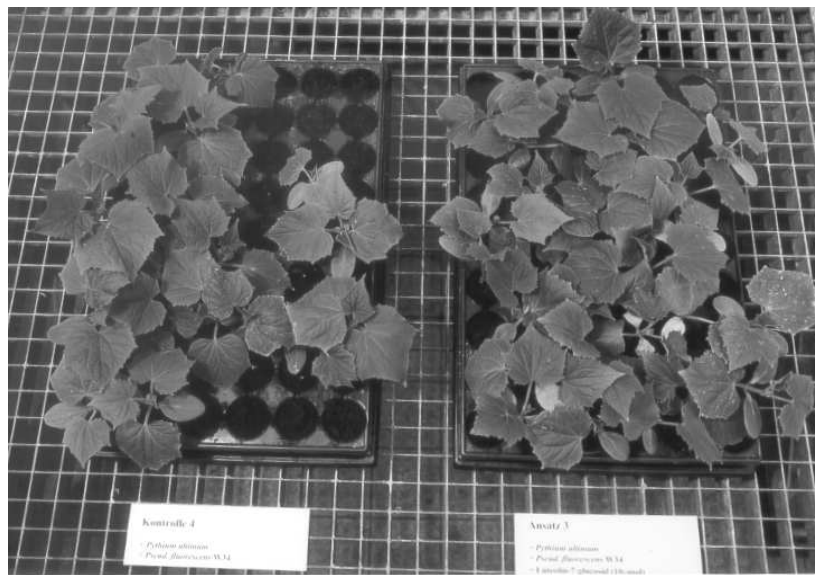
Tab. 3.14 Durchschnittliche Sproßlängen und Sproß-/Wurzeltrockengewichte von Gurkenpflanzen nach Einbringen von 4'-OH-Chalkon, Luteolin-7-Glucosid und Daidzein in mit *Pythium* versetzten Boden.

Behandlungsvariante	Sproßlänge (cm/Pflanze)	Sproß- trockengewicht (g/Pflanze)	Wurzel- trockengewicht (g/Pflanze)	Gesamt- biomasse (g/Pflanze)
+ <i>Pythium</i> (Kontrolle)	8,0(±2,2)	0,47(±0,15)	0,38(±0,21)	0,85(±0,35)
+ 4'-OH-Chalkon (30µM/Bodenlösung)	10,4(±5,8)*	0,49(±0,15)	0,48(±0,15)	0,97(±0,23)
+Luteolin-7-Glucosid (10µM/Bodenlösung)	10,3(±5,7)	0,30(±0,20)	0,33(±0,23)	0,66(±0,38)
+Daidzein (30µM/Bodenlösung)	9,8 (±3,1)	0,43(±0,18)	0,41(±0,18)	0,84(±0,28)

* Signifikant auf 5%-Niveau.

Bei einer kombinierten Anwendung des vorher im Pflanzentest alleine unwirksamen Bakteriums *Pseudomonas fluorescens* W34 und entweder Luteolin-7-Glucosid (10µmol/l) oder Daidzein (30µmol/l) als Zusatzsubstanzen, konnten signifikant erhöhte Auflaufraten der Testpflanzen erzeugt und somit bei dem genannten Bakterienisolat eine antagonistische Wirkung hervorgerufen werden (Abb. 3.23a,b).

a)



b)

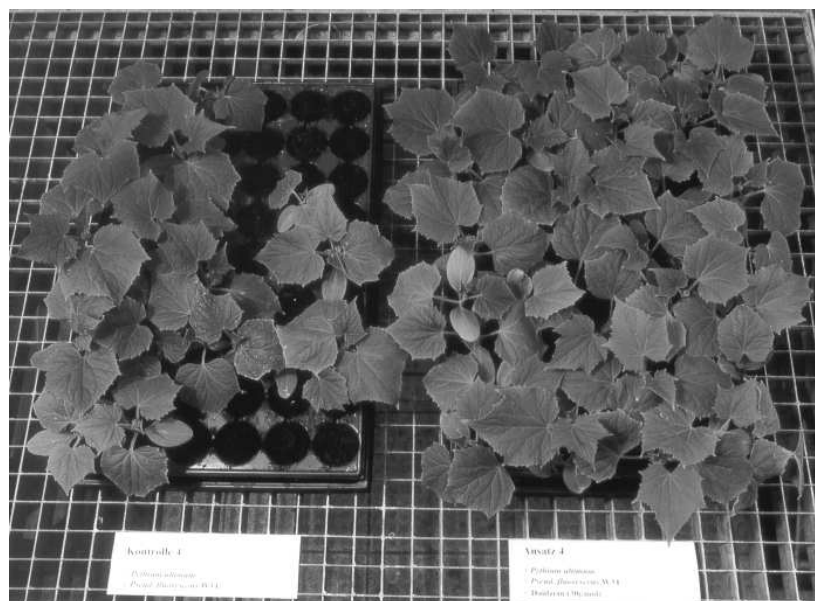


Abb. 3.23a,b Einfluß der Samenbehandlung mit *P. fluorescens* W34 in Kombination mit Bodenbehandlungen mit Luteolin-7-Glucosid (10µmol/l) (a) und Daidzein (30µmol/l) (b) auf die Auflaufzeiten von Gurken; Pflanzenbestand zum Zeitpunkt der Bonitur der Auflaufzeiten.

3.6 Analyse phenolischer Substanzen aus dem Wurzelexsudat von *Cucumis sativus* L.

Zum Nachweis und zur Identifizierung von Flavonoiden im Wurzelexsudat von *Cucumis sativus* L. (Sorte Delikateß) wurde die Adsorptionsfähigkeit dieser phenolischen Verbindungen an Cellulose-Acetat ausgenutzt (Recourt et al. 1991). Die Gurkenkeimlinge wurden in Petrischalen kultiviert, wobei die Wurzeln immer direkten Kontakt zu den Filtern hatten (Kap. 2.11.1, Abb. 2.2). Die mit dem Wurzelexsudat ausgeschiedenen Flavonoide konnten an die Filter adsorbieren, von denen sie später mit Methanol extrahiert und durch chromatographische Verfahren isoliert und qualitativ analysiert wurden. Hauptsächlich die Absorptionsspektren spielen hierbei eine Rolle. Da Flavonoide typischerweise je ein Absorptionsmaximum in den Wellenlängenbereichen 240 bis 285nm (Bande 1) und 300 bis 550nm (Bande 2) (Markham, 1982) besitzen, werden im folgenden auch nur diejenigen Fraktionen der Exsudate diskutiert, die in diesen Wellenlängenbereichen Absorptionsmaxima besitzen und somit in einzelne Untergruppen der Flavonoide eingeordnet werden können. Der Einfluß der Inokulation mit einem antagonistischen Bakterium (*P. fluorescens* W24) und dem pathogenen Pilz *Pythium ultimum* auf die Zusammensetzung des Wurzelexsudates wurde bei diesen Versuchen ebenfalls untersucht.

3.6.1 HPTLC-Analyse

Eine eindimensionale Dünnschichtchromatographie wurde mit dem Wurzelexsudatextrakt aus 80 unbehandelten Gurkenkeimlingen durchgeführt, die vier Tage kultiviert worden waren (Variante A₁). Unter der UV-Lampe waren bei Licht der Wellenlänge 256nm drei Komponenten sichtbar. Bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366nm wurden die Eigenfluoreszenzen dieser Komponenten deutlich (Abb. 3.24). Substanz 1 ($R_f = 0,32$)¹⁴ leuchtete orange, Substanz 2 ($R_f = 0,35$) und Substanz 3 ($R_f = 0,59$) zeigten eine blaßgelbe Farbe. Der Auftragungsspot (Origin) war ebenfalls gelblich.

¹⁴ R_f -Wert = Strecke von Auftragsstelle bis Substanz-Spot / Strecke von Auftragsstelle bis Laufmittelfront. Der R_f -Wert charakterisiert das Verhalten eines Stoffes in bezug auf die Wechselwirkungen mit der DC-Platte und dem Laufmittel.

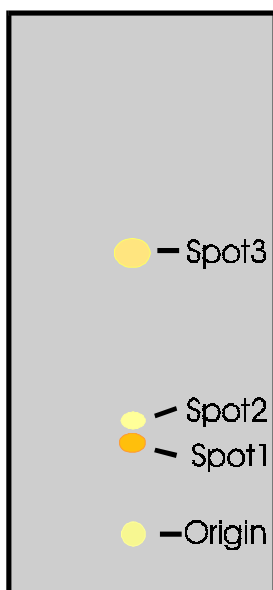


Abb. 3.24 Skizziertes charakteristisches Spotmuster auf einer HPTLC-Platte nach eindimensionaler Auftrennung des Wurzelexsudatextraktes von *Cucumis sativus* L. (Sorte Delikateß) bei Betrachtung unter UV-Licht (366 nm).

Die UV-Absorptionsspektren dieser drei aus der Exsudatprobe isolierten Substanzen wurden mit Hilfe eines Densitometers direkt von der HPTLC-Platte aufgenommen, wodurch die für eine Identifizierung wichtigen UV-Absorptionsmaxima jeder Substanz bestimmt werden konnten (Tab. 3.15).

Tab. 3.15 Lage der Absorptionsmaxima der UV-Spektren der durch HPTLC aufgetrennten phenolischen Substanzen aus dem Wurzelexsudat von *Cucumis sativus* L.

Komponenten	Absorptionsmaxima (nm) des UV-Spektrums
1	252 / 348
2	271
3	240 / 264 / 413

Das UV-Absorptionsspektrum des Origin wurde ebenfalls aufgenommen. Es wies bei 280nm ein Absorptionsmaximum auf.

Durch einen Vergleich mit UV-Spektren bekannter Flavonoide aus der Literatur (siehe Kap. 2.11.3.1) konnte keine dieser Substanzen genau identifiziert werden. Allerdings zeigte die Substanz 1 ein für Flavone bzw. für Flavonole typisches Absorptionsspektrum, denn diese Flavonoidgruppen besitzen UV-Absorptionsmaximalwerte zwischen 240-280nm (Bande 1) und

zwischen 310-385nm (Bande 2). Substanz 3 zeigte ein auronähnliches UV-Spektrum, mit Maximalwerten zwischen 230-270nm (Bande 1) und 380-430nm (Bande 2).

3.6.2 HPLC-Analyse

Die getrockneten Wurzelexsudatextrakte wurden für die HPLC-Analyse in je 40µl MeOH gelöst. 10µl dieser Lösung wurde jeweils zur Analyse verwendet. Alle im folgenden dargestellten Chromatogramme wurden im Bereich von 240-360nm detektiert. Die Peakhöhen beziehen sich auf relative Absorptionseinheiten (AU). In den abgebildeten Chromatogrammen wurden diejenigen Peaks mit Nummern versehen, die klare und somit verwertbare Absorptionsspektren aufwiesen. Zur Übersicht sind die Retentionszeiten und die Maximalwerte der UV-Absorption jeder einzelnen Fraktion jeweils tabellarisch aufgeführt.

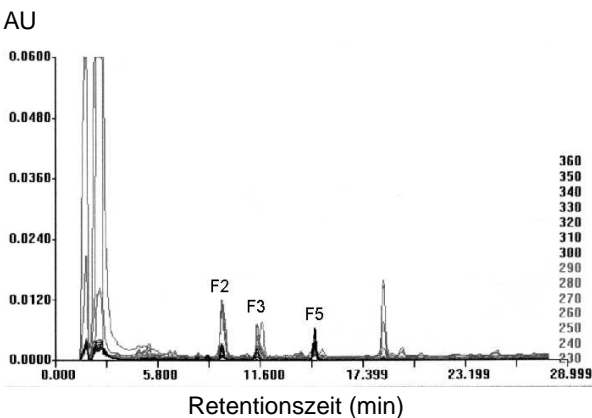
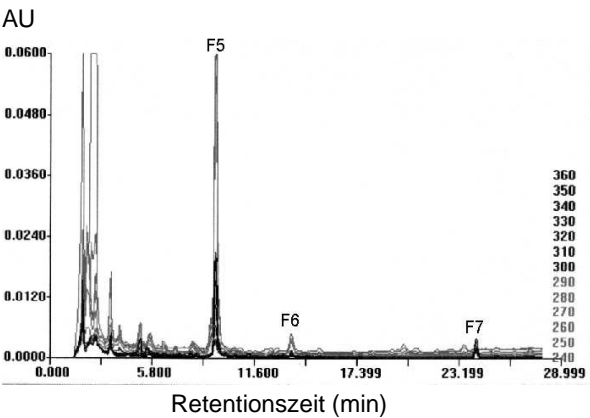
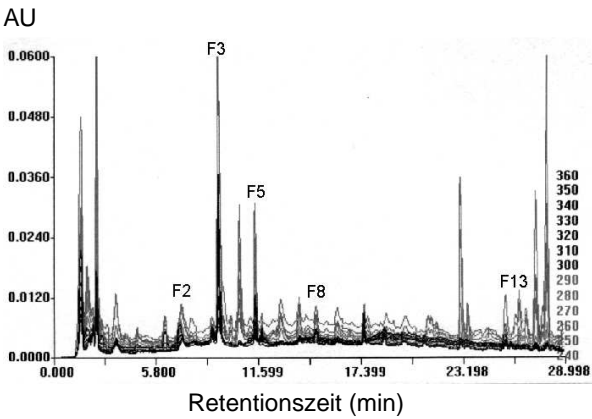
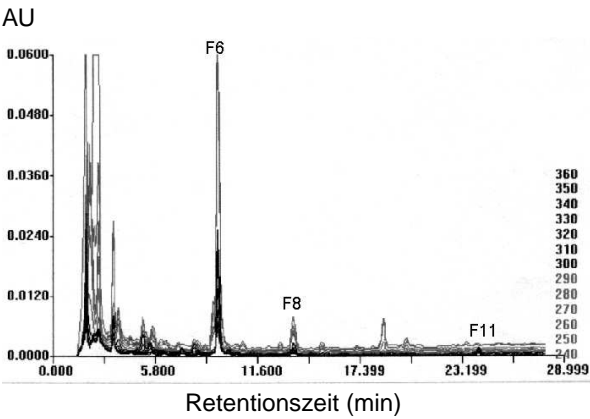
Die erhaltenen Daten über Retentionszeiten und UV-Absorptionsmaxima der Spektren wurden mit entsprechenden Daten von Flavonoidstandards einer institutseigenen Datenbank verglichen, die durch die vorliegende Arbeit auch erweitert wurde. Die Daten über die Standardsubstanzen wurden unter exakt denselben Meßbedingungen gewonnen wie sie auch bei der Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Proben herrschten.

In Abbildung 3.25 sind die HPLC-Chromatogramme der einzelnen Exsudatvarianten dargestellt. Für diese Darstellung wurden aus den Ergebnissen der Versuchswiederholungen jeweils ein für eine Variante typisches Chromatogramm ausgewählt.

Analyse des Wurzelexsudates unbehandelter Keimlinge (Varianten A₁ und A₂)

Variante A₁

Nach viertägigem Wachstum unbehandelter Gurkenkeimlinge (Variante A₁) konnten insgesamt elf verschiedene Fraktionen mit UV-Absorptionsspektren im Bereich von 200-360nm aus der Exsudatprobe isoliert werden (siehe Abb. 3.25 und Tab. 3.16), wobei mengenmäßig vor allem Fraktion F6 auffiel.



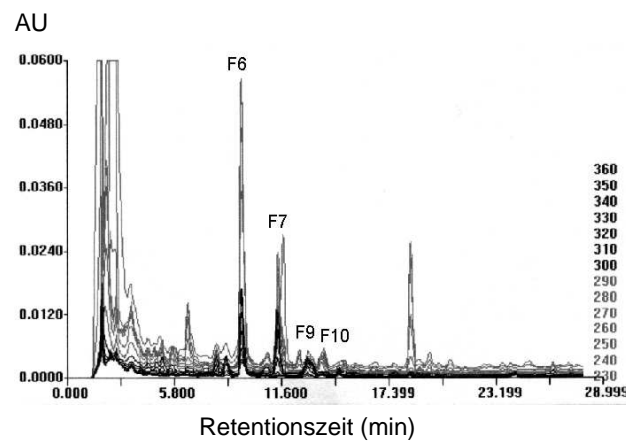


Abb. 3.25 HPLC-Chromatogramme der verschiedenen Varianten von Wurzelexsudat aus *Cucumis sativus* L. Oben links: Variante A₁ (unbehandelte Keimlinge; viertägige Kultivierung). Oben rechts: Variante A₂ (unbehandelte Keimlinge; siebentägige Kultivierung). Mitte links: Variante B (mit *Pseudomonas fluorescens* W24 behandelte Samen; viertägige Kultivierung), Mitte rechts: Variante C (mit *Pythium ultimum* behandelte Keimlinge; viertägige Kultivierung), Unten: Variante D (Kombinationsbehandlung mit *Pseudomonas fluorescens* W24 und *Pythium ultimum*; viertägige Kultivierung). Alle Fraktionen, deren UV-Absorptionsspektren zwei Maximalwerte aufwiesen, wie es für Flavonoide typisch ist, sind beschriftet.

Tab. 3.16 Retentionszeiten und UV-Absorptionsmaxima der Fraktionen aus Variante A₁.

Fraktion	Retentionszeit (min)	Wellenlänge (nm) der maximalen UV-Absorption
F1	3,450	257
F 2	3,760	273
F 3	5,113	286
F 4	7,132	269
F 5	9,170	279
F 6	9,388	257, 354
F 7	12,924	280
F 8	13,676	282, >360
F 9	15,286	280
F 10	18,776	244
F 11	24,172	285, 337

Nach Vergleich der Retentionszeiten und der Wellenlängen der maximalen UV-Absorption konnte bei keiner Fraktion aus dieser Variante eine Übereinstimmung mit einer Standardsubstanz aus der Flavonoid-Datenbank gefunden werden, allerdings war sowohl in bezug auf die Retentionszeit als auch in bezug auf das UV-Absorptionsspektrum Fraktion F7 dem Flavanonglycosid Naringin sehr ähnlich. Nach einer Retentionszeit von 12,7min wurde Naringin als Standard detektiert und zeigte unter den gewählten Meßbedingungen auch nur einen Absorptions-Maximalwert bei 282nm. Ein mit der Auswertungs-Software berechneter SI (Similarity)-Faktor zeigte jedoch keine für eine Determination ausreichende Übereinstimmung der beiden Substanzen an.

Durch Hinzunahme der aus der Literatur über Flavonoide bekannten Daten war eine Einordnung folgender Fraktionen in bestimmte Flavonoidgruppen möglich:

Die größte Fraktion (Peak 6) könnte anhand der Maximalwerte in die Flavonol- oder Flavongruppe eingeordnet werden, Peak 8 in die Auron- und Peak 11 in die Chalkongruppe, wobei die letztgenannte Substanz mengenmäßig eine unbedeutende Rolle im Exsudat spielte.

Variante A₂:

Nach siebentägigem Wachstum unbehandelter Gurkenkeimlinge (Variante A₂) konnten insgesamt 16 verschiedene Fraktionen mit UV-Absorptionsspektren im Bereich von 200-360nm aus der Exsudatprobe isoliert werden (siehe Abb. 3.25 und Tab. 3.17). Wieder ließ sich eine Hauptfraktion (F3) erkennen, die der Hauptfraktion (F6) in A1 entspricht: Sowohl Retentionszeit als auch UV-Absorptionsspektrum stimmten überein. Fraktion F6 stimmte mit Fraktion F7 von A1 überein (siehe Markierung (*) in Tab. 3.17).

Tab. 3.17 Retentionszeiten und UV-Absorptionsmaxima der Fraktionen aus Variante A₂.

Fraktion	Retentionszeit (min)	Wellenlänge (nm) der maximalen UV-Absorption
F1	6,320	280
F2	7,244	259, 314
F3*(=F6 aus A ₁)	9,427	257, 354
F4	10,575	279
F5	11,492	280, >360
F6*(=F7 aus A ₁)	12,990	279
F7	13,907	275
F8	14,883	232, 265
F9	16,091	264
F10	17,588	294
F11	23,156	257
F12	25,690	289
F13	26,435	242, 280 (sh)
F14	26,897	278
F15	27,411	274
F16	28,045	274

Insgesamt wurden in dieser Exsudatvariante 14 Fraktionen detektiert, die in Probe A₁ nicht vorhanden waren. Auch hier führte ein Vergleich mit Standards aus der Datenbank nicht zu einer Identifikation der aufgetrennten Fraktionen. Aufgrund ihres Spektrums ließ sich die Fraktion 2 durch Vergleich mit Daten aus der Literatur allerdings in die Flavongruppe einordnen, die Fraktionen 8 und 13 wiesen Ähnlichkeiten mit den als Bitterstoffen in den Cucurbitaceen vorkommenden Cucurbitacinen auf, die bei den für diese Fraktionen detektierten Wellenlängen UV-Licht ebenfalls maximal absorbieren. Ein direkter Vergleich mit verschiedenen Cucurbitacin-Standards (Cucurbitacin B, E und I) zeigte jedoch keine genaue Übereinstimmung.

Analyse des Wurzelexsudates von Keimlingen nach Samenbehandlung mit *P. fluorescens* W24 (Variante B)

Nach vier Tagen Wachstum von Gurkenkeimlingen, deren Samen mit *P. fluorescens* W24 inokuliert wurde, konnten im Wurzelexsudat insgesamt sieben verschiedene Fraktionen mit UV-Absorptionsspektren im Bereich von 200-360nm nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.25, Tab. 3.18). Alle Fraktionen dieser Exsudatprobe stimmten mit Fraktionen aus Variante A1 überein, was in Tabelle 3.18 entsprechend vermerkt ist.

Tab. 3.18 Retentionszeiten und UV-Absorptionsmaxima der Fraktionen aus Variante B.

Fraktion	Retentionszeit (min)	Wellenlänge (nm) der maximalen UV-Absorption
F1*(=F1 aus A ₁)	3,497	257
F2*(=F2 aus A ₁)	4,005	273
F3*(=F3 aus A ₁)	5,152	283
F4*(=F5 aus A ₁)	8,741	280
F5*(=F6 aus A ₁)	9,546	257, 353
F6*(=F8 aus A ₁)	13,735	281, >360
F7*(=F11 aus A ₁)	24,232	287,335

Vier in Variante A₁ enthaltene Fraktionen (F4, F7, F9 und F10) konnten hier nicht wiedergefunden werden.

Analyse des Wurzelexsudates von Keimlingen nach Behandlung mit *Pythium ultimum* (Variante C)

Nach der Behandlung von Gurkenkeimlingen mit dem Pathogen *Pythium ultimum* wurden im Wurzelexsudat insgesamt sieben verschiedene Fraktionen mit UV-Absorptionsspektren im Bereich von 200-360nm detektiert (siehe Abb. 3.25).

Die Hauptfraktion F2 entsprach in bezug auf Retentionszeit und Spektrum der Hauptfraktion (F6) aus der Probe mit unbehandelten Keimlingen (A₁), ihre Konzentration war hier aber deutlich geringer. Sechs, in Variante A₁ nicht vorhandene, Fraktionen wurden detektiert und analysiert (Tab. 3.19): Fraktion 5 zeigte ein chalkontypisches Absorptionsspektrum. Bei Fraktion 3 könnte es sich aufgrund der UV-Absorptionsmaxima um ein Isoflavon handeln.

Tab. 3.19 Retentionszeiten und UV-Absorptionsmaxima der Fraktionen aus Variante C.

Fraktion	Retentionszeit (min)	Wellenlänge (nm) der maximalen UV-Absorption
F1	8,689	320
F2*(=F6 aus A ₁)	9,493	256,354
F3	11,479	267, 302 (sh)
F4	11,717	276
F5	14,699	230, 336
F6	18,611	234
F7	26,283	278

Analyse des Wurzelexsudates nach Kombinationsbehandlung von Samen und Keimlingen mit *P. fluorescens* W24 und *Pythium ultimum* (Variante D)

Nach der Behandlung von Gurkenkeimlingen mit dem Pathogen *Pythium ultimum* und dem Antagonisten *P. fluorescens* W24 wurden im Wurzelexsudat zwölf verschiedene Fraktionen mit UV-Absorptionsspektren im Bereich von 200-360nm detektiert (siehe Abb. 3.25, Tab. 3.20).

Tab. 3.20 Retentionszeiten und UV-Absorptionsmaxima der Fraktionen aus Variante D.

Fraktion	Retentionszeit (min)	Wellenlänge (nm) der maximalen UV-Absorption
F1*(=F3 aus A ₁ , B)	5,192	285
F2*(=F4 aus B)	5,726	268
F3	6,597	240
F4	7,534	285
F5*(=F1 aus C)	8,636	319
F6*(=F6 aus A ₁ , F2 aus C, F5 aus B)	9,520	257, 354
F7*(=F3 aus C)	11,532	269, 302 (sh)
F8*(=F4 aus C)	11,736	274
F9	13,076	230, 316
F10*(=F8 aus A ₁ , F7 aus B)	13,801	280,>360
F11	18,611	230
F12*(=F7 aus C)	26,330	279

Die Hauptfraktion F6 entsprach wiederum der Hauptfraktion in den Varianten A1 (unbehandelte Keimlinge), B (mit *P. fluorescens* W24) und C (mit *Pythium ultimum*). Die Fraktionen 1 und 10 kamen in Variante A1 und in Variante B vor (Tab. 3.20), Fraktion 2 wurde in Variante B schon einmal detektiert. Die Fraktionen F5, F7, F8 und F12 stimmten mit Fraktionen überein, die bisher nur in Variante C isoliert wurden. Vier weitere Fraktionen (F3, F4, F9 und F11) kamen nur in dieser kombiniert behandelten Variante vor, konnten aber nicht in eine Flavonoidgruppe eingeordnet werden.

3.7 Einfluß von Luteolin-7-Glucosid auf das Wachstum von *Pseudomonas fluorescens* W34

Die exemplarischen Untersuchungen zum Einfluß von Luteolin-7-Glucosid unter kontrollierten Bedingungen im Fermenter sollten einen Hinweis darauf geben, ob der Stamm *Pseudomonas fluorescens* W34 das in den Pflanzentests bei den Kombinationsbehandlungen wirksame Flavonoid verwerten und sich hierdurch etwa schneller in der Rhizosphäre der Gurken etablieren kann. Bei diesen Versuchen war das Mineralmedium M9 im Fermenter nach der Sterilisation und vor der Beimpfung des Kulturgefäßes mit dem Bakterienstamm mit einer wässrigen Standardlösung des Flavonoids angereichert worden, so daß die Endkonzentration im Kulturgefäß 10 µM betrug. Dies entsprach der im Boden wirksamen Konzentration des Flavonoids bezogen auf die Bodenlösung. Die Kontrolle enthielt nur M9-Medium. Der pH-Wert während der Fermentationen war in Anlehnung an den bei den Gewächshausversuchen herrschenden Boden-pH-Wert auf 6,2 eingeregelt worden. In Abbildung 3.26 ist die Wachstumskurve des *Pseudomonas*-Stammes im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

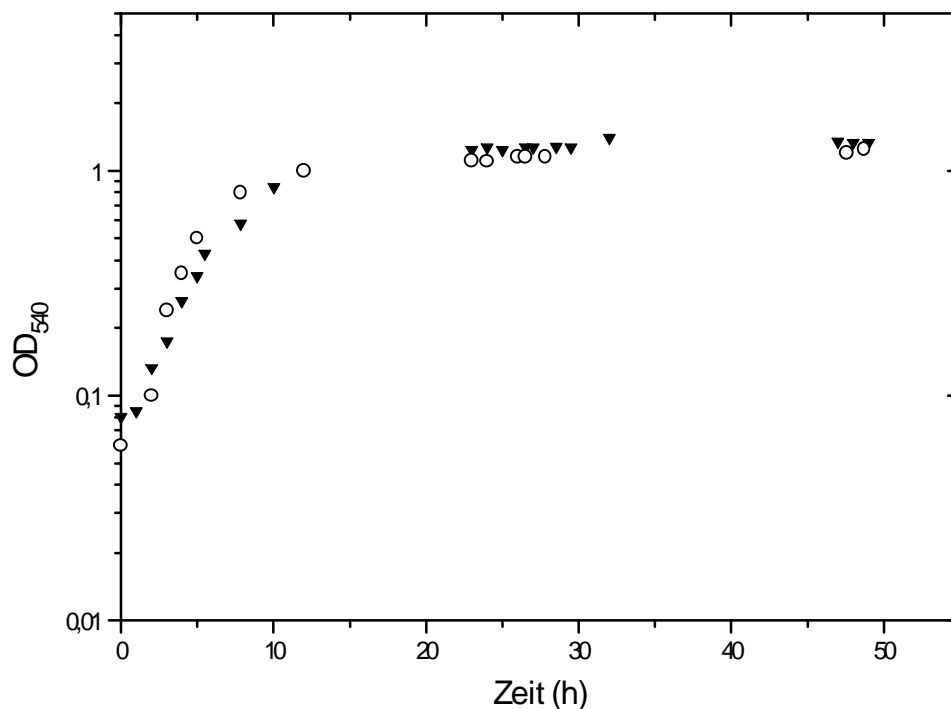


Abb. 3.26 Wachstum einer Fermenterkultur von *Pseudomonas fluorescens* W34 in M9-Medium ohne (Dreiecke) und mit Zusatz von Luteolin-7-Glucosid (Kreise) (Konzentration im Medium 10 µM) bei einem Sauerstoffgehalt von 80% und einem pH-Wert von 6,2.

Mit dem Flavonoid-Zusatz im Medium wuchs der Stamm *P. fluorescens* W34 tendenziell schneller. Die Unterschiede zur Kontrolle in der exponentiellen Phase des Wachstums waren jedoch nach dem Paardifferenzierungstest nach Wilcoxon bei einer festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% nicht signifikant. Somit war unter den gewählten Bedingungen kein direkter Einfluß des Flavonoids auf das Wachstum von *Pseudomonas fluorescens* W34 festzustellen.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung von Pflanzen-Pathogen-Testsystemen und Einsatz von Antagonisten *ad planta*

Der entscheidende Schritt bei der Entwicklung eines biologischen Mittels zur Schädlingsbekämpfung ist die Überprüfung der Wirksamkeit *ad planta* in einem adäquaten und aussagekräftigen Testsystem. Ein wichtiger Teil dieser Arbeit bezog sich deshalb auf die Entwicklung eines in allen wesentlichen Merkmalen standardisierten Pflanzentestsystems, das sich durch eine sehr hohe Reproduzierbarkeit auszeichnen sollte. Zu diesen Merkmalen gehört zum einen die Gewährleistung einer immer gleich hohen Krankheitswahrscheinlichkeit durch die Erzeugung reproduzierbarer Infektionen und zum anderen das effektive Einbringen der zu testenden, potentiell antagonistischen Bakterien.

4.1.1 Die Erzeugung reproduzierbar Infektionen

Im Hinblick auf die angestrebte Festlegung optimaler Infektionsbedingungen für den Einsatz im Gewächshaus und geeigneter Inokulumproduktionsbedingungen im Labor, war es zunächst von großer Relevanz, die genaue Identität des *Pythium*-Isolates festzustellen. Die Auswahl des Pathogens für das zu entwickelnde Testsystem war an Festlegungen innerhalb des Verbundprojektes „Biologischer Pflanzenschutz gegen bodenbürtige Pathogene“, in welches diese Arbeit integriert war, gebunden. Vereinbart wurde demnach auch die Verwendung des aus Hohenheim stammenden *Pythium* sp.-Isolates.

Durch die morphologischen Untersuchungen konnte das für diese Arbeit zur Verfügung stehende Isolat als *Pythium ultimum* var. *ultimum* determiniert werden, denn die aus der lichtmikroskopischen Analyse gewonnenen Daten über die Charakteristika der Fortpflanzungsorgane und Hyphen stimmten mit den aus der Literatur (Van der Plaats-Niterink 1981) bekannten überein:

Ein Oosporendurchmesser von 17-20µm und ein Oogoniendurchmesser von 20-24µm ist typisch für diese Varietät, ebenso eine Oosporenwandstärke von 2µm. Das seltene Auffinden von Antheridien in den mikroskopischen Präparaten läßt sich damit erklären, daß der haploide Zustand, der in der Zeit vorliegt, in der die Meiose in den Antheridien stattfindet, nur sehr kurz existierte. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, Antheridien in Präparaten anzutreffen, relativ gering. Die Abwesenheit von Sporangien und Zoosporen in den mikroskopischen Präparaten ist ebenfalls ein Hinweis darauf, daß es sich um die genannte Varietät handelt, da diese weder Sporangien noch Zoosporen bildet, wenn sie, wie hier, bei Raumtemperatur kultiviert wird. Dies unterscheidet die Varietät auch von dem sonst sehr ähnlichen *Pythium ultimum* var. *sporangiiiferum*.

Die Schwierigkeiten bei der morphologischen Bestimmung von *Pythium*-Isolaten liegen zum einen in der oft von äußeren Bedingungen beeinflussten Variabilität in der Ausprägung und Charakteristik der morphologischen Merkmale. Andererseits gelingt es oftmals nicht, alle für eine Determination wichtigen Fortpflanzungsorgane in Laborkulturen zu produzieren (Hendrix und Papa 1974).

Eine Bestätigung der morphologischen Identifikation des *Pythium*-Isolates lieferte die molekularbiologische Differenzierung durch die PCR. In der Literatur ist diese Methode bereits bei einigen *Pythium*-Arten (Chen et al. 1992, Wang und White 1997) und einer Reihe anderer phytopathogener Pilze, wie beispielsweise *Fusarium* sp. (Hering, 1997), *Phytophthora* sp. (Lee und Taylor 1990) und *Sclerotinia* sp. (Kohn et al. 1989) angewendet worden. Durch die molekularbiologische Untersuchung konnte das *Pythium*-Isolat anhand der ITS-Fragmente der Art *Pythium ultimum* zugeordnet werden. Mit dieser Determinationsmethode ließ sich allerdings nur eine Einordnung auf Artebene vornehmen, nicht aber eine Unterscheidung der Varietäten. Sie stellt aber in Kombination mit morphologischen Untersuchungen ein nützliches Werkzeug zur Determination unbekannter *Pythium*-Isolate dar, da Gene, die für ribosomale RNA (rDNA) kodieren, relativ gut untersucht, hochkonserviert und die Spacer-Regionen der rDNA bei eng verwandten Organismen unterschiedlich sind. Aus diesem Grund ist die Untersuchung solcher Gene bei taxonomischen und phylogenetischen Studien als sehr nützlich anzusehen.

Nach der Determination des Pilz-Isolates als *Pythium ultimum* var. *ultimum* wurde der Bodenwassergehalt und die Temperatur des zu entwickelnden Testsystems so festgelegt, daß eine optimale Entwicklung des Pathogens zu erwarten war. Eine Bodenwasserkapazität von 60% der WK_{max} und eine Lufttemperatur von 20-25°C waren aber nicht nur förderlich für den pathogenen Pilz, sondern auch für die Keimung der Testpflanzen.

Um eine reproduzierbare, hohe Krankheitswahrscheinlichkeit bei den Testpflanzen zu erreichen, sollten nun die Auswirkungen unterschiedlicher *Pythium ultimum*-Inokulummengen auf den Befall von Gurken untersucht werden.

Hierzu wurde ein Mischinokulum aus Myzel und Fortpflanzungsorganen des Pathogens produziert und eingesetzt, das den Vorteil bot, genau dosierbar zu sein. Das Einmischen der verschiedenen *Pythium*-Inokulummengen führte dann, unter Beachtung einer gleichbleibenden Bodenwasserkapazität von 60% der WK_{max} , auch zu reproduzierbaren Infektionen, deren Stärke jeweils anhand der Auflaufraten vier Wochen nach der Aussaat quantifiziert werden konnte. Einen für den Einsatz im Testsystem genügend hohen Infektionsgrad bzw. genügend reduzierte Auflaufraten erzeugten *Pythium*-Mengen von 0,25g pro 320g Bodensubstrat. Diese Inokulummenge verursachte Auflaufraten um 23% und wurde für den standardisierten Einsatz im Testsystem ausgewählt. Allerdings konnten derart reproduzierbare Infektionen nur dann erzeugt werden, wenn die Inokulation des Bodensubstrates mit *Pythium* direkt vor der Aussaat der Gurkensamen erfolgte. Eine frühere Verseuchung des Bodens mit infektiösen Einheiten des Pathogens führte zu unkontrolliert hohem Befall, der eine starke Vermehrung des Inokulums vermuten läßt und der einen antagonistischen Effekt der später im Testsystem eingesetzten Bakterien verfälscht hätte. Die aufgrund der Einstellung optimaler Entwicklungsbedingungen angenommene schnelle Vermehrung des Pathogens konnte durch die Bestimmung der Vermehrungseinheiten im Boden nachgewiesen werden. Innerhalb von 14 Tagen vermehrte sich das anfängliche *Pythium*-Inokulum um das siebenfache. Ehle et al. (1981) beschreiben bei vorab

mit *Pythium* inokuliertem Erds substrat ebenfalls unkontrollierbar hohe und nicht reproduzierbare Infektionen.

Durch die hiermit gewährleistete Erzeugung reproduzierbarer Infektionen war fortan eine zuverlässige Einschätzung des antagonistischen Potentials verschiedener Pseudomonaden *ad planta* möglich geworden.

4.1.2 Das Einbringen von Antagonisten

Ein zweiter Schwerpunkt bei der Entwicklung des Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystemen lag in der Untersuchung und Festlegung geeigneter Möglichkeiten zur effektiven Ausbringung der potentiellen Antagonisten. Die Applikationsmethode für mikrobielle Antagonisten sowie der Applikationsort sind von großer Bedeutung für die Wirkungssicherheit und die Wirtschaftlichkeit bei der Bekämpfung bodenbürtiger Phytopathogene.

In der Literatur werden Verfahren zur Applikation fluoreszierender Pseudomonaden durch Behandlung des Bodens mit Zellsuspensionen (Wilkinson et al. 1982) und mit an Trägersubstanzen gebundenen Bakterien (Jones et al. 1984, Fravel et al. 1985) beschrieben. Dadurch konnten allerdings oft keine durchschlagenden Bekämpfungserfolge erzielt werden. Außerdem war aufgrund von Verdünnungseffekten eine massive Einbringung der Antagonisten in bestimmten Abständen erforderlich, um die notwendige Antagonistendichte im Boden zu erhalten. Die Kosten für die hierzu erforderlichen Präparatmengen von 500-5000 kg/ha sind nach Philipp (1988) sehr hoch. Als eine für Gewächshauskulturen geeignete Form der Ausbringung von Antagonisten wird die Verteilung in Bewässerungssystemen diskutiert (Schroth und Weinhold 1986), weil der vertikale Wassertransport im Boden in einem hohen Maß an der Verbreitung von Pseudomonaden beteiligt ist (Parke et al. 1986). Am weitesten verbreitet und wirtschaftlich am günstigsten bei der Bekämpfung bodenbürtiger Pathogene ist die Ausbringung der antagonistischen Mikroorganismen mit Hilfe von Saatgutbehandlungen (Chao et al. 1986, Weller und Cook 1986, Callan et al. 1990). Von den Samen ausgehend, können bakterielle Antagonisten die Keimlingswurzel frühzeitig besiedeln, sich in der Rhizosphäre etablieren und somit einen optimalen Schutz vor dem Pathogen bieten (Cook und Baker 1983).

Auch bei dem in dieser Arbeit entwickelten Testsystem zur Bekämpfung von *Pythium ultimum* bot sich eine Samenapplikation der Pseudomonaden an, da das Pathogen schon direkt zum Zeitpunkt der Aussaat in schadenserregender Menge (0,25g/320g Bodensubstrat) im Boden vorliegen sollte, um reproduzierbar hohe Infektionen erzeugen zu können.

Zur Samenapplikation wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Standardverfahren entwickelt, in dem als Austrocknungsschutz und Haftmittel Gummi Arabicum verwendet wurde, da gram-negative Bakterien wie Pseudomonaden sehr empfindlich auf Trocknung und Hitze reagieren (Weller 1988). Anders als beispielsweise *Bacillus* sp. können sie keine Endosporen produzieren, um in Form von diesen in Phasen der Austrocknung und Hitze zu überdauern. In einem getrockneten Feldboden waren nach zwei Wochen keine gram-negativen aeroben Stäbchenbakterien mehr zu finden, während *Bacillus*-Arten aufgrund ihrer Sporenproduktion bis zu elf Monate überlebten (Chen und Alexander 1973).

Unabhängig vom eingesetzten *Pseudomonas*-Isolat lagen durch Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens zur Saatgutapplikation mit Gummi Arabicum nach einer Trocknungsphase von einer Stunde die Organismenzahlen bei 10^7 cfu pro Samenkorn, unabhängig davon, ob die Samen einzeln oder portionsweise behandelt wurden. Allerdings handelt es sich bei dieser Zahl um einen Mindestwert der pro Samen vorhandenen Bakterien, da angenommen werden kann, daß durch eine Rückisolierung – trotz Optimierung der Methode – nicht alle an der Samenoberfläche haftenden Bakterien abgelöst werden können. Aus diesem Grund konnte davon ausgegangen werden, daß der tatsächlich vorliegende Bakterientiter größer als 10^7 cfu pro Samenkorn war. Daß dieser durch die Sameninkrustierung erreichte Bakterientiter pro Samen, für eine erfolgreiche Besiedelung der Wurzeln durchaus ausreichend war, zeigten die Rückisolierungsversuche von Pseudomonaden auf auswachsenden Keimlingswurzeln, die unter Kapitel 4.3.1 diskutiert werden.

Nach Brown und Beringer (1983), Suslow und Schroth (1982) und Weller et al. (1995) ist für Pseudomonaden eine Mindest-Inokulumgröße von 10^6 - 10^8 Zellen pro Samen Voraussetzung für das Überleben der Bakterien im Inkrustierungsmaterial bei kurzfristiger Lagerung und für eine anschließende Vermehrung in der Rhizosphäre. Daß mögliche negative Einflüsse der Samenummantelungssubstanz Gummi Arabicum auf die Keimung der Gurkensamen auszuschließen waren, zeigte die hohe Keimfähigkeit ($\geq 93\%$) behandelter Samen.

Die Einbettung von Pseudomonaden in Gummi Arabicum bietet auch längerfristig einen wirksamen Schutz vor Austrocknung (Kloepper und Schroth 1981). Nach Wölk (1990) nimmt die Zahl der lebensfähigen Pseudomonaden in einer Gummi Arabicum-Kruste erst nach 30 Tagen signifikant ab. Auch eine Reihe weiterer Substanzen können zur Ummantelung von Saatgut verwendet, wie beispielsweise Alginat (Lewis und Papavizas 1987), Xanthan Gum (Suslow und Schroth 1982), Polyvinylalkohol (Höflich 1989), Carboxymethylcellulose (Geels und Schippers 1983), Methylcellulose (Weller und Cook 1986, Callan et al. 1990), Lignit (Jones et al. 1984) und Vermiculit (Suslow und Schroth 1982). In diesen Untersuchungen konnten ebenfalls Organismenzahlen von 10^7 bis zu 10^8 cfu pro Samenkorn erreicht werden. In jedem Fall lagen aber die Organismenzahlen nach Anwendung von Haftmitteln deutlich höher als bei einem Einsatz von wässrigen Suspensionen. Tauchbehandeltes Saatgut wurde in der vorliegenden Arbeit – vor allem in Hinblick auf das Adhäsionsvermögen der *Pseudomonas*-Isolate – ebenfalls untersucht, und es zeigte sich, daß die Zahl der rückisolierbaren Zellen (10^7 cfu/Samen) vergleichbar war mit jener nach Saatgutinkrustierung mit Gummi Arabicum. Allerdings wurde die Rückisolierung im Falle der Tauchbehandlung sofort (ohne Trocknungsphase) angeschlossen, so daß ein direkter Vergleich der Effektivität der Behandlungen nicht sinnvoll ist.

4.1.3 Aussagekraft des Testsystems

Insgesamt stellt das hier entwickelte Testsystem *Pythium ultimum*/Gurke eine zuverlässige, praxisnahe und praktikable Methode dar, die Wirkung von potentiell antagonistischen Pseudomonaden zu untersuchen.

Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem in der unter den festgelegten Bedingungen hohen Reproduzierbarkeit der Infektionen durch eine genau dosierte Pathogen-Inokulummenge, denn

oft wird berichtet, daß unzuverlässige Befallsgrade der Kontrollen Screening-Versuche mit Antagonisten gegen *Pythium ultimum* scheitern lassen (Koch, BBA Darmstadt; Junge, FZB Biotechnik Berlin; Puls, BBA Kleinmachnow, mündliche Mitteilungen) oder zu variablen Wirkungen der Bakterien führen (Vogt et al. 1997), so daß eine sichere Einschätzung des antagonistischen Potentials oft nicht möglich ist (Lenck 1995, Müller 1995). Die Zuverlässigkeit des Testsystems wurde auch durch die Einbeziehung von Referenzstämmen (*P. putida* II 232 und *P. chlororaphis* I 112) bestätigt, die im Hinblick auf ihre antagonistische Wirkung gegen *Pythium ultimum* gut untersucht sind.

Die dargestellte Methode zur Samenbehandlung war für alle untersuchten Pseudomonaden-Stämme effektiv, so daß davon ausgegangen werden kann, daß auch potentielle Antagonisten aus anderen Bakteriengattungen auf diese Weise effektiv ins Testsystem eingebracht werden können. Diese im Rahmen der Entwicklung des Testsystems standardisierte Methode der Saatgutinkrustierung wurde außerdem auch in den Untersuchungen von Feder (1997) zur Entwicklung einer DNA-Sonde für *P. fluorescens* W34 erfolgreich bei Bodenversuchen eingesetzt.

Da Gurkenpflanzen vor allem im Keimlingsstadium empfindlich gegenüber *Pythium*-Infektionen sind, konnten die Versuche unter den gegebenen Bedingungen bereits vier Wochen nach der Aussaat abgeschlossen werden. Das Testsystem *P. ultimum*-Gurke zeichnet sich also nicht nur durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus, sondern ist auch als Routinetest gut geeignet für umfangreiche Untersuchungen zum Screening antagonistischer Mikroorganismen *in vivo*. So konnte beispielsweise Junga (1997) dieses Testsystem unter genauer Einhaltung der hier angegebenen Bedingungen in bezug auf Pathogen-Inokulum, Bodenfeuchtigkeit und Temperatur in Untersuchungen zur antagonistischen Wirksamkeit verschiedener *Bacillus*-Stämme erfolgreich anwenden; die Inkrustierung von Gurkensamen mit vegetativen *Bacillus*-Zellen erfolgte nach leichter Abwandlung der hier entwickelten Methode.

Mit der angewendeten Methode zur Einbringung der Bakterien ins System (Saatgutapplikation), die aus Gründen der Praxishöhe und Wirtschaftlichkeit gewählt wurde, kann allerdings nur die Wirkung der Bakterien auf das Ausmaß der Pflanzeninfektionen untersucht werden, jedoch nicht die mögliche direkte Beeinflussung der *Pythium*-Vermehrungseinheiten im Boden, wie es beispielsweise bei einer Gießapplikation der Bakterien der Falle wäre. In dieser Hinsicht wäre es interessant, bei der Anwendung des Testsystems zusätzlich die Wirkung von Gießapplikationen zu testen.

Zusätzlich interessant für eine sichere Bewertung von Bakterien wie *P. fluorescens* W24, die sich im Testsystem eindeutig als wirksam charakterisieren ließen, wäre die kontrollierte „Verschärfung“ der Bedingungen, zum Beispiel durch den Einsatz noch größerer Pathogen-Inokulummengen, um die „Wirkungsgrenze“ des Bakteriums festzustellen.

Wünschenswert wäre auch, eine Methode zur Verfügung zu haben, die unabhängig von der Pflanzensorte eingesetzt werden kann. Hierzu müßte die Spezifität des Systems durch weitere Infektionstests mit der angewendeten Pathogen-Inokulummenge und anderen Gurkensorten bzw. Gemüsearten überprüft werden.

4.2 Antagonistische Wirksamkeit fluoreszierender Pseudomonaden gegen *P. ultimum* und Verbesserung der Wirkungssicherheit durch Flavonoide

4.2.1 Das antagonistische Potential der Pseudomonaden

In einem ersten Schritt zur Bestimmung des antagonistischen Potentials der verschiedenen *Pseudomonas*-Stämme wurde mit Hilfe von Dualkulturtests der Einfluß von *Pseudomonas fluorescens* W24, *P. fluorescens* W34 und *P. fluorescens* W5 auf das Wachstum von *Pythium ultimum* untersucht.

In diesen Tests zeigten die beiden Isolate *P. fluorescens* W24 und W34 jeweils Hemmwirkungen gegenüber dem Pathogen, deren Stärke jedoch medienabhängig war. Auf den Medien M9A und TSA waren bei beiden Stämmen große Hemmhöfe, zwischen 16 und 22mm, ausgebildet, was im Falle von M9A den Untersuchungen von Müller (1995) entspricht. Im Falle der Anzucht auf KBA wurden unterschiedlich ausgeprägte Hemmaktivitäten von *P. fluorescens* W24 und W34 festgestellt. Nur das erstgenannte Isolat erzeugte auf diesem Medium einen deutlichen Hemmhof von 15mm. PDA als dextrosereiches Nährmedium, das vor allem das Wachstum von Pilzen begünstigt (Beever und Bollard 1970), unterdrückte die Hemmstoffausscheidung dieser Pseudomonaden im Vergleich mit den anderen verwendeten Medien erheblich und kann somit für eine Bewertung der Wirksamkeit von Antagonisten als ungeeignet angesehen werden.

Insgesamt war die Fähigkeit zur Hemmung des Pathogens bei dem Isolat *P. fluorescens* W24 am größten, denn auf allen vier untersuchten Medien wurden deutliche Hemmhöfe gemessen. Auch das Isolat *P. fluorescens* W34 hatte einen hemmenden Einfluß auf das Pathogen, dagegen zeigte das Isolat *P. fluorescens* W5 diesen Tests zufolge, unabhängig vom Medium, keine hemmende Wirkung auf *Pythium ultimum*.

Bekannt ist, daß fluoreszierende Pseudomonaden eine Reihe von Sekundärmetaboliten bilden können, die auf bodenbürtige Pathogene wachstumshemmend oder toxisch wirken, wie z. B. Pyrrolnitrin, Pyoluteorin, 2,4-Diacetylphloroglucinol und Cyanwasserstoff (Défago und Haas 1990). Die Wirkung solcher Stoffe auf Pathogene kann, wie auch in der vorliegenden Arbeit, durch Dualkulturtests nachgewiesen werden. Bekannt ist auch, daß die Fähigkeit zur Bildung von Hemmstoffen oft auch eine große Rolle bei der antagonistischen Wirkung von Pseudomonaden im Boden spielt (Howie und Suslow 1986).

Nach Brown (1974), Schroth und Hancock (1981), Campbell (1986), Weller (1988) und Kloepper (1991) gibt es jedoch keine generelle Beziehung zwischen der Fähigkeit eines Isolates, ein Pathogen *in vitro* zu hemmen und der Unterdrückung von Krankheiten *ad planta*. In Dualkulturen kann ein Antagonismus beobachtet werden, der allein auf Antibiose und Nährstoff-Konkurrenz beruht, *ad planta* können jedoch noch verschiedene komplexere (auch indirekte) Mechanismen zur Wirkung kommen, wie beispielsweise die Induktion von Resistenz oder die Stimulierung des Pflanzenwachstums¹⁵. Letztlich mindert auch die Tatsache, daß die Bildung

¹⁵ Die Stimulation des Pflanzenwachstums kann teilweise aber wiederum auch auf die Wirkung von Antibiotika zurückgeführt werden, die die natürlich vorhandene Rhizosphärenmikroflora hemmen können (Agnihotri und

von Sekundärstoffen in hohem Maße von Umweltbedingungen und der Nährstoffversorgung abhängig ist die Aussagekraft von Dualkulturtests.

In einem zweiten Schritt zur Analyse der antagonistischen Wirksamkeit der fluoreszierenden *Pseudomonaden* wurden deshalb unter Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystems Untersuchungen *ad planta* durchgeführt.

Das Bakterienisolat *Pseudomonas fluorescens* W24 zeichnete sich im Gewächshaustest durch eine hohe antagonistische Wirksamkeit aus, denn die durch *Pythium ultimum* verursachten Schäden konnten durch dieses Isolat deutlich reduziert werden. Dies zeigte sich in der im Vergleich zur *Pythium*-Kontrolle signifikant höheren Auflaufrate der Pflanzen von 76% nach Samenbehandlung mit dem Bakterium und Kultivierung der Pflanzen in verseuchtem Boden. *Pseudomonas fluorescens* W24 kann demnach als wirksamer Antagonist gegen *Pythium ultimum* eingestuft werden. Auch Vogt und Buchenauer (1997) stuften *P. fluorescens* W24 als wirksamen Antagonisten ein, denn sie erreichten durch Samen- und Gießbehandlung des Bodens mit diesem Isolat in zeitgleich mit der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen in einem gärtnerischen Betrieb ebenfalls hohe Auflaufraten von 70 bis 80% bei Gurken. Allerdings war hier nicht genau bekannt, wie groß das *Pythium*-Inokulum war, da der Boden nicht künstlich verseucht wurde. Außerdem wiesen sie für *P. fluorescens* W24 die Fähigkeit zur Induzierung systemischer Resistenz gegen TNV (Tabak-Nekrose-Virus) und den durch *Sphaerotheca fuliginea* verursachten Echten Mehltau nach, der im Gurkenanbau ebenfalls zu großen Schäden führen kann.

Die Bakterienisolate *Pseudomonas fluorescens* W34 und W5 zeigten im standardisierten Pflanzen-Pathogen-Testsystem keine antagonistische Wirkung, denn die Anzahl der nach vier Wochen aufgelaufenen gesunden Pflanzen unterschied sich jeweils nicht signifikant von der *Pythium*-Kontrolle.

Die durch die Anwendung des Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystems erhaltenen Ergebnisse stimmen demnach für zwei Bakterienisolate mit jenen überein, die mit Hilfe von Dualkulturen erzielt wurden. *P. fluorescens* W24 erwies sich sowohl in der Dualkultur als auch *ad planta* als Antagonist gegen *Pythium ultimum*. Die schon im Dualkulturtest festgestellte Unwirksamkeit des Isolates *P. fluorescens* W5 wurde im Pflanzentestsystem ebenfalls bestätigt. Bei dem Isolat *P. fluorescens* W34 ergab sich zwischen der Wirkung in der Dualkultur mit *P. ultimum* und der Wirkung im Pflanzentest eine Diskrepanz. Auf zwei von vier Nährmedien zeigte das Isolat eine deutliche Antibiose, die sich in relativ großen Hemmhöfen ausdrückte. Im Pflanzen-Pathogen-Testsystem wurden dagegen nach Einbringung des Isolates durch Samenbehandlung im Vergleich zur *Pythium*-Kontrolle keine signifikant erhöhten Auflaufraten erzeugt.

Die Anwendung der beiden Referenz-Stämme *Pseudomonas chlororaphis* I 112 und *Pseudomonas putida* II 232 im Pflanzentestsystem führte zu signifikant erhöhten Auflaufraten. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Koch (1997) beschriebenen überein, der ebenfalls ein deutlich antagonistisches Verhalten der Stämme gegenüber *Pythium ultimum* an Gurken feststellen konnte.

Vaartaja 1967), denn unter sterilen Bedingungen konnte die Förderung des Pflanzenwachstums durch Antagonisten nicht immer beobachtet werden (Lifshitz et al. 1987).

Um auch Hinweise auf einen latenten Befall zu erfassen, wurden bei allen Gewächshausversuchen auch die Wachstumsparameter der Gurkenpflanzen erfaßt. Bei Anwendung des Isolates *Pseudomonas putida* II 232 war der latente Befall am geringsten, denn hier war das Wurzelgewicht im Vergleich zur *Pythium*-Kontrolle signifikant erhöht, es lag aber immer noch deutlich unter dem Gewicht der nicht infizierten Kontrollen. Alle anderen Bakterien-Isolate hatten offensichtlich nicht zu einer Verbesserung des latenten Befalls der aufgelaufenen Gurkenpflanzen geführt.

Insgesamt wies der Stamm *P. putida* II 232 also das höchste antagonistische Potential auf, denn er erzeugte nicht nur hohe Auflaufraten, sondern schützte auch die Pflanzenwurzel wirksam vor *Pythium*-Infektionen. Der Referenzstamm *P. chlororaphis* I 112 war, gemessen am Auflaufen der Pflanzen, ebenfalls hochwirksam gegen *Pythium*, allerdings hatte er nicht das Potential, die Wurzeln der Pflanzen zu schützen. Durch die positive Wirkung dieser beiden Referenz-Stämme im Testsystem konnte einerseits dessen hohe Aussagekraft bei der Prüfung von Pseudomonaden gegen *Pythium* bestätigt werden, andererseits konnten die Wirkungen der Stämme *P. fluorescens* W5, W24 und W34 mit denen der Referenzstämme verglichen werden. Ein hohes antagonistisches Potential kann im Pflanzentest somit auch für *P. fluorescens* W24 nachgewiesen werden, was dieses Isolat für die Weiterentwicklung als biologisches Mittel gegen bodenbürtige Pathogene wie *Pythium* interessant macht. Die Tatsache, daß nach einer vierwöchigen Versuchsdauer kein Einfluß der Saatgutbehandlung mit *P. fluorescens* W24 auf das Trockengewicht der Gurkenpflanzen festgestellt werden konnte, schließt allerdings mögliche positive Effekte auf das Pflanzenwachstum oder die Ernte in länger angelegten Tests nicht aus.

Im Hinblick auf eine potentielle Umsetzung dieser praxisnah erhaltenen Ergebnisse in die gärtnerische Praxis, wäre es wünschenswert, dieses wirksame Isolat (und natürlich auch die beiden Referenzstämme) unter dem wirtschaftlich wichtigen Aspekt des Einflusses auf die Ernte langfristigen Tests im Unterglasanbau von Gurken zu unterziehen. Interessant wäre auch festzustellen, welche Rolle die bei *P. fluorescens* W24 *in vitro* nachgewiesene Antibiotika-Produktion für die Wirkungssicherheit im System *P. ultimum*/Gurke spielt. Aufschluß könnte hierzu beispielsweise die Herstellung und der Einsatz spezifischer Mutanten geben (Howie und Suslow 1986). Denkbar wäre auch die Untersuchung des Kulturfiltrates in bezug auf eine pathogenhemmende Wirkung im Boden.

Insgesamt stellt das Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystem eine Methode dar, mit der eine Wirkungsprüfung durchgeführt werden kann, die für eine praktische Anwendung von Pseudomonaden erforderlich ist. Die gewählte hohe Bodenfeuchtigkeit bot nicht nur dem Pathogen optimale Infektionsbedingungen, sondern war auch Voraussetzung dafür, daß die in Gummi Arabicum eingebetteten Bakterien sich um den quellenden Samen herum vermehren und sich entlang des Wasserfilms auf der Wurzel etablieren konnten, denn es liegen Befunde vor, daß eine hohe Bodenfeuchtigkeit und regelmäßiges Gießen als Bewässerungsmethode den Vorgang der Wurzelbesiedelung vom Samen aus fördern (Liddell und Parke 1989). Stellt sich ein Bakterium (wie im Falle von *P. fluorescens* W24) bei diesem bewußt unter einem hohen Infektionsdruck¹⁶ durchgeführten Test als wirksam heraus, so kann man annehmen, daß es

¹⁶ Ein hoher Infektionsdruck herrschte im Testsystem einerseits wegen der, schon zum Zeitpunkt der Samenkeimung vorliegenden relativ großen *Pythium*-Inokulummenge und andererseits wegen der Einstellung idealer Infektionsbedingungen für diesen Pilz.

zumindest hinsichtlich des verwendeten Pathogens (*P. ultimum*) eine allgemein hohe Wirkungssicherheit hat. Ob sich diese Wirkungssicherheit beispielweise auch auf den Schutz anderer Gemüsearten übertragen läßt, war im Rahmen dieser Arbeit nicht zu klären. Diese Fragestellung wäre allerdings ein interessanter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

4.2.2 Flavonoide als Wirksubstanzen im Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystem

Die Gewährleistung einer hohen Wirkungssicherheit stellt oft das größte Problem bei der Entwicklung biologischer Pflanzenschutzmittel dar (Becker und Schwinn 1993). Ein weiterer wichtiger Schwerpunkt dieser Arbeit war deshalb, zu untersuchen, ob Zugaben ausgewählter, niedrig konzentrierter Flavonoide und Flavonoidglycoside die Wirksamkeit und damit auch die Wirkungssicherheit eines Bakterienisolates im Testsystem positiv beeinflussen können und somit als Mittel zur Erhöhung der Wirkungssicherheit in Frage kommen. Diese Untersuchung wurde beispielhaft mit dem Bakterienisolat *Pseudomonas fluorescens* W34 durchgeführt. Sechs verschiedene Verbindungen wurden als Zusatzsubstanzen in das Pflanzen-Pathogen-Testsystem eingebracht und ihr Einfluß auf die antagonistische Wirksamkeit dieses Stammes bewertet. Dabei hatte dieser Stamm zuvor gegenüber *Pythium ultimum* im Gewächshaustest kein antagonistisches Verhalten gezeigt (er erzeugte nur Auflaufraten um 30%). Wurde er aber kombiniert mit entweder 4'-OH-Chalkon (30µmol/l), Luteolin-7-Glucosid (10µmol/l) oder Daidzein (30µmol/l) angewendet, konnten signifikant erhöhte Auflaufraten festgestellt werden (50-60%), was eine Steigerung der Wirkung um das bis zu zweifache bedeutet. Wurden diese Verbindungen alleine – ohne gleichzeitige Anwendung von *P. fluorescens* W34 – in den Boden eingemischt, so wurde im Falle von 4'-OH-Chalkon eine signifikante Erhöhung der Auflaufraten auf 60% festgestellt. Man kann demnach davon ausgehen, daß das Pathogen direkt von dieser Chalkon-Verbindung beeinflußt wurde.

Eine direkte Wirkung ausgewählter Flavonoid-Verbindungen auf verschiedene pflanzenpathogene Pilze wurde auch von Emerson und Crandall (1996) berichtet. In Untersuchungen anderer Autoren (Stanghellini und Hancock 1971) zum Einfluß von Wurzelexsudat und Exsudat von Bohnensamen auf die Keimung von Sporangien und auf das Myzelwachstum von *Pythium ultimum* wurden ebenfalls direkte Wirkungen nachgewiesen. Neuere Untersuchungen (Vogt und Buchenauer 1997, Colbert et al. 1993a,b) wiesen hemmende Wirkungen auf bodenbürtige pathogene Pilze in Erdkulturen durch andere Gruppen phenolischer Verbindungen wie beispielsweise Salicylsäurederivate nach.

Durch eine Bodenbehandlung mit 4'-OH-Chalkon (30µmol/l), Luteolin-7-Glucosid (10µmol/l) oder Daidzein (30µmol/l), jeweils kombiniert mit *P. fluorescens* W34, wurde weder das Wurzeltrockengewicht noch die Gesamtbiomasse der Pflanzen verändert, d. h. der latente Befall mit *Pythium* konnte durch diese Behandlungen nicht abgeschwächt werden. Die Wirkung von *Pseudomonas fluorescens* W34 gegen *Pythium* konnte allerdings durch den Einsatz von Luteolin-7-Glucosid (10µmol/l) bzw. Daidzein (30µmol/l) im Testsystem soweit erhöht werden, daß nun auch dieser Bakterienstamm die durch das Pathogen verursachten Schäden wirksam reduzieren konnte.

Eine Reihe von Mechanismen zur Klärung der Frage, welche Rolle die in Kombinationsbehandlung wirksamen Flavonoide in der Interaktion zwischen Pflanzenwurzel, Pathogen und Antagonist im Boden spielen könnten, sind vorstellbar: Einerseits kann das Wachstum der Pseudomonaden direkt gefördert werden und damit zu einer größeren Präsenz dieser Bakterien in der Rhizosphäre führen. Pseudomonaden können nicht nur einfache aromatische Verbindungen abbauen (Golovleva et al. 1992), sondern auch komplexere wie z. B. Flavonoide. So liegen Befunde vor, daß Pseudomonaden Flavone und Flavanone abbauen können (Schultz et al. 1974, Rao und Cooper 1994). Außerdem ist bekannt, daß bestimmte Flavonoide wie Luteolin, Daidzein und Quercetin, in nano- bzw. mikromolaren Konzentrationen zugesetzt, nicht nur das Wachstum von Rhizobien, sondern auch das von Pseudomonaden fördern (Hartwig et al. 1991, D'Arcy-Lameta und Jay 1987). Eine Förderung des Bakterienwachstums konnte für das im Pflanzentest mit *P. fluorescens* W34 wirksame Luteolin-7-Glucosid *in vitro* allerdings nicht nachgewiesen werden, denn die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten unter den festgelegten Bedingungen keinen Einfluß des in mikromolaren Konzentrationen zugegebenen Flavonoids auf das Wachstum von *P. fluorescens* W34 in Fermenterkulturen. Weitere Versuche unter „rhizosphärenähnlicheren“ Bedingungen, beispielsweise unter mikroaeroben Bedingungen unter Ausschluß anderer C-Quellen, wären daher von Interesse. In anderen Untersuchungen (Müller 1995) wurde das Aglucon Luteolin eingesetzt und zeigte ebenfalls keinen Einfluß auf das Wachstum von *P. fluorescens* W34, allerdings wurde eine Abnahme des Gehaltes von Luteolin im Medium bei der Kultivierung von *Pseudomonas fluorescens* W34 verzeichnet. Somit kann zumindest angenommen werden, daß *P. fluorescens* W34 derartige C-Quellen nutzen kann.

Bei den im Pflanzentest wirksamen Kombinationsbehandlungen mit Flavonoiden und *P. fluorescens* W34 könnten aber auch durch die Umsetzung von Flavonoiden Substanzen entstanden sein, die hemmend auf das Pathogen gewirkt haben. Hartwig et al. (1991) beschreiben außerdem, daß bestimmte Flavonoide (Luteolin und Quercetin), in mikromolaren Konzentrationen angewendet, das Wachstum von *Pythium ultimum in vitro* direkt hemmen können.

Sehr wenig ist darüber bekannt, wie sich Flavonoide im Boden verhalten. Zahlreiche Prozesse können ihre Konzentration beeinflussen. Mikrobieller Abbau durch Bodenbakterien (Golovleva et al. 1992, Barz et al. 1970) sowie ein chemischer Abbau und eine Adsorption an Bodenpartikel sind möglich. Interessant wäre deshalb, die Konzentration der in den Boden eingebrachten Flavonoide im Zeitverlauf zu bestimmen. Dies könnte zum Beispiel durch die Anwendung von Reportergenen geschehen. Man könnte auf diese Weise Aussagen darüber machen, wie lange die Flavonoide im Boden in biologisch aktiver Form vorliegen.

Insgesamt sollte in weiterführenden Untersuchungen vor allem die Aufklärung der den beschriebenen Wirkungen tatsächlich zugrundeliegenden Mechanismen im Vordergrund stehen, damit geklärt werden kann, ob die hier beschriebenen wirksamen Kombinationsbehandlungen aus Bakterien und Flavonoiden (Luteolin-7-Glucosid bzw. Daidzein) auch auf andere Pseudomonaden oder Bakteriengruppen ausgeweitet werden können. Außerdem sollte im Hinblick auf eine mögliche Anwendung in der Praxis geklärt werden, ob die Wirkungssicherheit der Kombinationsbehandlungen mit derjenigen von Fungiziden verglichen werden kann (z. B. durch den Einsatz von fungizidbehandeltem Saatgut). Letztlich hätte nämlich die Anwendung von Verbindungen aus der Stoffklasse der Flavonoide zur Erhöhung der Wirkungssicherheit

antagonistischer Bakterien vom ökonomischen Standpunkt her betrachtet den Vorteil, daß, im Gegensatz zu Fungiziden, vermutlich nur geringe Mengen der Substanzen eingesetzt werden müßten.

4.3 Interaktionen zwischen *Pythium ultimum*, den Pseudomonaden und *Cucumis sativus*

4.3.1 Das Besiedelungsvermögen der Pseudomonaden

Von grundlegender Bedeutung für die Wirkung und Wirkungssicherheit von *Pseudomonas*-Stämmen, ist die Fähigkeit zur frühzeitigen und effizienten Wurzelbesiedelung (Weller 1988, Bull et al. 1991, Lugtenberg et al. 1991, Schippers et al. 1987), wodurch phytopathogene Pilze zurückgedrängt werden können (Schippers 1983). Hat sich beispielsweise eine *Pythium*-Zoospore durch die Ausscheidung adhäsiven Materials einmal an die Wurzeloberfläche gebunden und enzystiert, bleibt sie dort auch während einer fortschreitenden Zellwandsynthese bei der Wurzelkeimung (Grove und Bracker 1978, Gubler et al. 1989) und kann die Wurzel von hier aus infizieren. Sporangien von *P. ultimum* können außerdem innerhalb von 90min als Reaktion auf wasserlösliche und flüchtige Substanzen in Exsudaten (Nelson 1987) keimen und somit die Pflanzenwurzel oder den Samen schnell infizieren. Durch eine rasche Besiedelung der Wurzel durch die Pseudomonaden in mit *Pythium* verseuchtem Boden können deshalb mögliche Infektionsstellen des Pilzes auf der Wurzeloberfläche schon frühzeitig besetzt werden.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Besiedelungsstudien anhand von Rückisolierungsexperimenten durchgeführt, bei denen die verschiedenen *Pseudomonas*-Stämme über das Ausplattieren von Verdünnungen jeweils quantifiziert wurden. Zur Detektion der Pseudomonaden auf der Oberfläche der Samen und Keimlingswurzeln der Gurken wurde die Rasterelektronenmikroskopie verwendet. Sie bietet den Vorteil, lokale Interaktionen bzw. die Adhäsionsstellen der Bakterien direkt detektieren zu können. Die Anwendung der Elektronenmikroskopie ist vor allem dann optimal, wenn – wie in der vorliegenden Arbeit – einzelne Bakterienstämme nach Inokulation von Reinkulturen des jeweiligen Stammes eingesetzt werden (Dandurand et al. 1997, Chin-A-Woeng 1997).

Nach einer Tauchbehandlung von sterilen Gurkensamen mit Pseudomonaden konnte durch Rückisolierung festgestellt werden, daß sich im Durchschnitt zwei bis drei Zehnerpotenzen weniger Zellen als wie ursprünglich eingesetzt waren an der Samenoberfläche festsetzten. Die verschiedenen Stämme unterschieden sich dabei in ihrem Besiedelungsverhalten nicht wesentlich. Dies war auch bei entsprechenden Behandlungen steriler Wurzeln der Fall, bei denen die Rückisolierungstiter um ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger lagen als die jeweiligen Ausgangstiter. Wie die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, besetzten die Stämme *P. fluorescens* W34 und W24 die Gurkenrhizoplane mit Ausnahme der Wurzelspitze jeweils gleichmäßig. Jedoch konnte bei diesen Tauchinokulationen für den Stamm *P.*

fluorescens W34 eine Abhängigkeit der Dichte der Zellen vom jeweiligen Inokulumtiter festgestellt werden. Demnach war für eine gleichmäßige und dichte Besetzung der Rhizoplane nach einer Tauchbehandlung der Wurzeln ein Inokulumtiter von mindestens 10^7 cfu/Wurzel notwendig. Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den fünf untersuchten *Pseudomonas*-Stämmen bei diesen Untersuchungen kann man davon ausgehen, daß sich die *ad planta* gegen *Pythium* wirksamen Stämme *P. fluorescens* W24, *P. putida* II 232 und *P. chlororaphis* I 112 nicht durch ein stärkeres Adhäsionsvermögen von den unwirksamen Stämmen unterscheiden.

Problematisch ist allerdings die Übertragung der hier unter sterilen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse auf die Situation im Boden, denn dort beeinflussen wesentlich mehr Faktoren die Adhäsion an die Wurzel. Der Adhäsion von pflanzenassoziierten Bakterien an Wurzeloberflächen geht oft ein chemotaktisches Verhalten voran (Aguilar et al. 1988, Loake et al. 1988). Scher et al. (1985) zeigten, daß sich *Pseudomonas*-Stämme im Boden aktiv zu Sojabohnensamen hinbewegen und stellten die Hypothese auf, daß dies der erste Schritt zur Samen- und Wurzelbesiedelung sei. Für den zweiten Schritt, die Adhäsion selbst, können Pseudomonaden einerseits ihre Pili benutzen (Vesper 1987), andererseits spielen hierbei auch Oberflächenladungen und wurzeladhäsive Proteine (James et al. 1985, De Mot et al. 1991) eine Rolle. Glandorf et al. (1994) berichten in diesem Zusammenhang über im Wurzelexsudat enthaltene agglutinierende Substanzen. Ein Glycoproteinkomplex auf der Rhizoplane von Gurken ist nach Anderson et al. (1988) und Tari und Anderson (1988) bei einer Agglutination von *P. putida* wesentlich beteiligt. Bei der Besiedelung steriler Wurzeln durch *P. fluorescens*-Stämmen spielen offensichtlich auch lange O-Antigen-Seitenketten von Lipopolysacchariden eine Rolle (De Weger et al. 1987, De Weger 1988).

Der Stamm *P. fluorescens* W24 war nach seiner Einbettung in Gummi Arabicum bei der Sameninkrustierung offenbar eher als die beiden Stämme *P. fluorescens* W34 und W5 dazu in der Lage, die auskeimende Gurkenwurzel aktiv zu besiedeln. Bei einem Ausgangstiter von 10^8 cfu/Samen konnten nach zwei Tagen $2,3 \times 10^7$ cfu pro Längeneinheit Wurzel rückisoliert werden. Außerdem vermehrte sich dieser Stamm auf der Wurzeloberfläche innerhalb von zwei weiteren Tagen deutlich, wie die Titerzunahme um $2,4 \times 10^7$ cfu pro Längeneinheit Wurzel nach dieser Zeit zeigte. Bei den beiden anderen Stämmen (*P. fluorescens* W34 und W5) wurde ebenfalls eine von der Samenkruste ausgehende, jedoch insgesamt weniger ausgeprägte Wurzelbesiedelung und Vermehrung auf der Wurzel festgestellt.

Um mit dem Wachstum der Wurzel Schritt halten zu können, ist eine relativ kurze Generationszeit vorteilhaft, die nach Müller (1995) auch bei den beiden Stämmen *P. fluorescens* W24 und W34 gegeben ist, wogegen für den Stamm *P. fluorescens* W5 eine deutlich längere Generationszeit charakteristisch ist.

Bei der Untersuchung der Stämme auf der Keimlingswurzel durch die Raster-elektronenmikroskopie waren zwischen den Stämmen *P. fluorescens* W24 und W34 keine Unterschiede erkennbar. Beide Stämme bildeten innerhalb von zwei Tagen Mikrokolonien, die an der Wurzelbasis dominierten, deren Häufigkeit aber entlang der jungen Wurzel in Richtung Wurzelspitze deutlich abnahm. Oft lagen diese Zellansammlungen in „Spalten“, die sich zwischen kollabierten Wurzelhaaren gebildet hatten oder an furchenartig ausgeprägten Stellen der Rhizoplane. Ähnliche Beobachtungen machten auch Brown und Beringer (1993) und Chin-A-Woeng et al. (1997) bei anderen wurzelbesiedelnden Bakterien. Unter sterilen Bedingungen befinden sich wurzelbesiedelnde Bakterien demnach vorwiegend in Epidermis-Furchen und bei

älteren Wurzeln auch an der Abzweigung von Seitenwurzeln, weil in diesen Mikrohabitaten oft ein Feuchtfilm vorhanden ist, der einerseits für die Fortbewegung der Bakterien wichtig ist, und der andererseits ein mit Nährstoffen angereichertes Medium darstellt.

Der Befund, daß an der Wurzelspitze junger Wurzeln keine Bakterien detektiert werden konnten, wenn die Samen vorher mit Bakterien inokuliert worden sind, kann darauf zurückgeführt werden, daß die Vermehrung der Zellen mit dem Längenwachstum der Wurzel nicht mithalten konnte und die Bakterien somit die Spitzenzone der Wurzel nicht erreichen konnten. Andererseits ist aber auch nicht auszuschließen, daß durch diverse Waschvorgänge und durch die Fixierung Oberflächenmaterial der Wurzelspitze entfernt oder destabilisiert wurde und somit Artefakte gebildet wurden (Garland et al. 1979).

Die Untersuchungen machten nochmals deutlich, daß das angewendete Verfahren zur Sameninkrustierung als Einbringungsmethode für die Pseudomonaden geeignet war, denn diese konnten in der künstlichen Samenkruste überleben und von dort aus – ihren Fähigkeiten entsprechend – die Keimlingswurzel besiedeln.

Die unter sterilen Bedingungen gewonnenen Erkenntnisse über die Besiedelung von Wurzeln können nicht ohne weiters auf die komplexen Bodenverhältnisse übertragen werden, da die Aktivität eines Bakteriums dort durch abiotische Bedingungen wie Nahrungsangebot, Temperatur, Bodenfeuchtigkeit, pH-Wert, Bodenzusammensetzung (Latour et al. 1996) und durch die Konkurrenz mit anderen Bodenorganismen beeinflusst werden kann. Besonders eine hohe Bodenfeuchtigkeit scheint für eine effektive Besiedelung der Wurzeln durch gram-negative Bakterien wie Pseudomonaden im Boden von großer Bedeutung zu sein (Loper et al. 1985, Lidell und Parke 1989). Man kann deshalb annehmen, daß speziell die im Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystem eingestellte hohe Bodenfeuchtigkeit und die regelmäßige Bewässerung durch Gießen den passiven Transport der Pseudomonaden entlang der Wurzeln förderte und somit die Wurzeln unter Gewächshausbedingungen effektiv besiedelt werden konnten. Diese Untersuchungen können prinzipiell jedoch keine eindeutigen Informationen darüber geben, ob sich ein antagonistisches Bakterium wie *P. fluorescens* W24 im unsterilen Boden in der Rhizosphäre längerfristig durchsetzen kann. Um Bakterien unter natürlichen Bedingungen in der Rhizosphäre zu differenzieren, können z. B. immunologische Methoden (Benizri et al. 1997), Reportergentechniken (de Weger et al. 1991, Brennerova und Crowley 1994, Drahos et al. 1986, Araújo et al. 1996) und auch DNA-Hybridisierungstechniken¹⁷ (Holben et al. 1988) zum Einsatz kommen, deren Weiterentwicklung für den Einsatz in Routinetests angestrebt wird (Kloepper und Beauchamp 1992). Da sich außerdem die REM-Untersuchungen nur auf die Rhizoplane beschränkten, Antagonisten aber auch im Bereich der äußeren Rhizosphäre, die sich noch bis zu 3mm von der Rhizoplane entfernt erstreckt (Foster 1986), wirken können, lassen sich die Ergebnisse solcher *in vitro*-Untersuchungen nicht auf Bodenbedingungen übertragen.

4.3.2. Die Bedeutung der Wurzelexsudate

¹⁷ Die eigenen Untersuchungen gingen auch ein in die Entwicklung einer DNA-Sonde (Redecker et al., in Vorb.), mit der spezifisch *P. fluorescens* W34 detektiert werden kann.

Wurzeln haben durch ihre Exsudation einen großen Einfluß auf das Angebot an C-Quellen und Mineralien in der Rhizosphäre (Hu et al. 1995, Helal und Sauerbeck 1985). Ob sich antagonistische Bakterien in der Rhizosphäre etablieren können, hängt deshalb auch davon ab, wie effizient sie die angebotenen Substanzen für ihre Vermehrung nutzen können. Insbesondere Pseudomonaden sind in der Lage, ein breites Substratspektrum nutzen zu können (Palleroni 1984). In dieser Arbeit durchgeführte *in vitro*-Versuche, bei denen die verschiedenen *P. fluorescens*-Stämme vom Samen aus die Wurzel besiedelten, bestätigen dies, denn die bakterienbehandelten Samen waren zur Keimung auf Hoagland-Gelrite ausgelegt worden, in dem keine C-Quellen enthalten waren. Besonders der Stamm *P. fluorescens* W24 vermehrte sich auf der Wurzeloberfläche gut, obwohl er nur die von der Keimlingswurzel abgegebenen C-Quellen zur Verfügung hatte. Somit ergab sich die Frage, ob sich durch einen Vergleich der C-Quellenverwertung antagonistische von nicht antagonistischen Pseudomonaden unterscheiden lassen. Hierzu bot sich der Einsatz des im allgemeinen für die Identifizierung von Bakterien verwendeten kommerziellen BIOLOGTM-Systems an, denn Grundlage dieses Systems bilden spezielle C-Quellenverwertungsmuster von Bakterien. *P. fluorescens* W24 und W34 konnten jedoch – bis auf einen Unterschied – dieselben C-Quellen und auch gleich viele (fast 60%) nutzen, der Stamm W5 dagegen nutzte auch andere, insgesamt aber deutlich weniger der angebotenen Substrate. Bei diesem Stamm könnte demnach ein Zusammenhang zwischen der schwächer ausgeprägten Fähigkeit, verschiedenste C-Quellen nutzen zu können, und seiner Wirkungslosigkeit gegen *Pythium ad planta* bestehen. Die beiden Stämme *P. fluorescens* W34 und W24 konnten anhand ihrer C-Quellenverwertungsmuster allerdings nicht differenziert werden. Sie wurden derselben Phänotyp-Gruppe (*P. fluorescens* C)¹⁸ zugeordnet, was eine Diskrepanz zu den unterschiedlichen *ad planta*-Wirkungen gegen *Pythium* darstellt.

Wurzelexsudate dienen nicht nur den Bakterien der Rhizosphäre als Nährstoffe, sondern auch pathogenen Pilzen wie *Pythium*, dessen Zoosporen außerdem durch Wurzelexsudatinhaltstoffe angelockt und ihre Enzystierung und Infektionshyphenbildung stimuliert werden kann. (Zhou und Paulitz 1993, Nelson und Hsu 1994, Ingold und Hudson 1993, Kraft 1974, Singh 1965). Durch Wurzelexsudate kann demnach eine pilzliche Infektion gefördert werden.

Aufgrund ihrer herausragenden Rolle als Signalsubstanzen und Kontrollfaktoren der Pflanzen für die Rhizosphärenmikroflora (Phillips und Tsai 1992) und in der pflanzlichen Abwehr (Ebel 1986) konzentrierten sich die vorliegenden Untersuchungen des Wurzelexsudates verschieden behandelter Gurkenpflanzen auf die Flavonoide. Nach Giannasi (1988) kommen in den Cucurbitaceen sowohl C-Glycosylflavonoide als auch auch O-Methylflavonole sowie Quercetin, Apigenin und Luteolin vor. Diese Angaben beziehen sich aber nicht auf Wurzelexsudate. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob Flavonoide im Wurzelexsudate von Gurkenkeimlingen nachgewiesen werden können, wobei gleichzeitig der

¹⁸ Neuste Untersuchungen von kombinierten PCR/RFLP-Mustern der 16S rDNA (Vinuesa, Universität Marburg, mündliche Mitteilung) zeigten aber, daß sich diese beiden Stämme nicht nur auch genotypisch sehr ähnlich sind, sondern daß sie sich auch vom Typstamm *P. fluorescens* ATCC 12983 (Vinuesa et al. 1998) und von der bei Moore et al. (1996) beschriebenen *P. fluorescens*-Gruppe unterscheiden. Eine genaue Einordnung der beiden Stämme W34 und W24 muß also zu diesem Zeitpunkt noch offen bleiben. Insgesamt ist die Art *P. fluorescens* jedoch innerhalb der Gattung *Pseudomonas*, zu der sowohl fluoreszierende als auch nicht-fluoreszierende Arten zählen, auch nach neueren phäno- und genotypischen aber auch chemotaxonomischen Untersuchungen als sehr heterogen einzustufen (Vancanney et al. 1996).

Einfluß von *Pythium* und des Antagonisten *P. fluorescens* W 24 auf die Zusammensetzung des Exsudates bestimmt wurde. Sowohl die methanolische Extraktion der phenolischen Substanzen aus den bei den Exsudatgewinnungen verwendeten Cellulose-Acetat-Filtern als auch die Laufmittelgemische bei den Analysen waren auf die Auftrennung hydrophober Aglyca ausgerichtet, da Flavonoide im Wurzelexsudat überwiegend als Aglyca vorliegen (D'Arcy-Lameta 1986).

In der HPTLC-Analyse ließen sich drei Fraktionen auftrennen, die zwar deutliche Eigenfluoreszenzen aufwiesen und im Falle von Fraktion 1 und 3 auch typische flavonoidartige UV-Absorptionsspektren zeigten, die jedoch nach Vergleich mit Literaturdaten nicht identifiziert werden konnten. Mittels HPLC ließen sich im Wurzelexsudat unbehandelter Gurkenkeimlinge (Variante A₁) allerdings wesentlich mehr (11) und zudem andere Fraktionen auftrennen, weshalb diese empfindlichere Methode auch zur Analyse aller anderen Exsudatvarianten verwendet wurde. Manche Substanzen kamen nur in relativ geringen Konzentrationen vor, wurden aber trotzdem beachtet, weil auch bei niedrigkonzentrierten Substanzen im Exsudat eine hemmende oder fördernde biologische Aktivität in bezug auf die Wurzelbesiedler nicht auszuschließen ist.

Nach sieben Tagen Keimung (Variante A₂) waren im Exsudat unbehandelter Gurken fünf Substanzen mehr nachzuweisen als nach vier Tagen Keimung (Variante A₁). Auch handelte es sich im Exsudat der Variante A₂ um andere Substanzen als bei A₁, was durch Vergleich der Absorptionsspektren und Retentionszeiten deutlich wurde. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen von Vancura und Hovadik (1965), die ebenfalls eine Altersabhängigkeit bei der Zusammensetzung des Exsudates von *Cucumis sativus* beschrieben. Zur Untersuchung der Rolle von Exsudatinhaltsstoffen bei der Interaktion mit pathogenen und antagonistischen Mikroorganismen stand die Analyse des Exsudates nach nur vier Tagen Keimdauer im Vordergrund, weil die Gewächshausversuche gezeigt hatten, daß es sich in diesem Zeitraum entscheidet, ob ein Keimling dem Pathogen widerstehen und auflaufen kann, oder ob es zum Pre-Emergence-Damping-off kommt und der Keimling schon im Boden infiziert wird und abstirbt.

Unabhängig von der Behandlung der Keimlinge trat in allen Exsudaten nach einer Retentionszeit von 9,4min eine Fraktion auf, deren UV-Absorptionsspektrum bei 257nm und 354nm Maximalwerte besaß. Flavonoide aus der Gruppe der Flavonole bzw. der Flavone zeigen zwar ähnliche Spektren, jedoch war durch einen reinen Spektrenvergleich eine Identifikation der unbekannten Substanz nicht möglich. Die Substanz entspricht aber möglicherweise der Fraktion 1 aus der HPTLC-Analyse, welche sehr ähnliche Absorptionsmaximalwerte besaß (252 und 348nm). Interessanterweise war diese Substanz in allen Exsudaten auch dominierend, nur in Variante C (mit *Pythium* behandelte Keimlinge) lag sie in geringerer Konzentration vor. Insgesamt war die Exsudation bei dieser Variante stark beeinträchtigt, weil das Wurzelsystem durch die Infektion mit dem Pathogen stark reduziert war. Sechs detektierte Substanzen wurden nur in dieser Exsudatvariante gefunden, wobei eine Substanz (Fraktion 3) ein isoflavonoidähnliches Absorptionsspektrum aufwies. Da die Bildung dieser Substanzen direkt mit dem Einfluß des Pathogens in Zusammenhang steht, kann vermutet werden, daß auch einige von ihnen Abwehrcharakter haben (wie z. B. Phytoalexine).

Wurden die Keimlinge aus Samen angezogen, die mit dem im Gewächshaus wirksamen Antagonisten *P. fluorescens* W24 behandelt worden waren, so wurden dieselben phenolischen

Substanzen exsudiert wie in der unbehandelten Kontrolle. Allerdings traten bei zwei von drei Versuchswiederholungen vier Fraktionen nicht mehr auf. Da es sich hierbei um niedrigkonzentrierte Substanzen handelte, ist allerdings fraglich, ob sie von den Pseudomonaden als Nährsubstanzen verwendet worden sind.

Bei der Kombinationsbehandlung (Variante D: *Pythium* und *P. fluorescens* W24) wurde die auch *ad planta* festgestellte Schutzwirkung des Bakteriums bestätigt, denn im Vergleich zur *Pythium*-Kontrolle (Variante C) waren die Pflanzen deutlich weniger geschädigt und exsudierten in „normalem“ Umfang. Die meisten der detektierten phenolischen Substanzen kamen auch schon in den Varianten vor, bei denen entweder *Pythium* oder *P. fluroescens* W24 zugegeben worden waren. Die Zahl der Fraktionen, die in dieser Variante erstmals auftraten und somit spezifischer waren, schwankte in den einzelnen Versuchswiederholungen allerdings zwischen zwei und fünf, weshalb diese bei der Analyse nicht weiter beachtet wurden.

Insgesamt stellte sich das verwendete analytische Verfahren in bezug auf die Identifizierung von Substanzen zwar als unzureichend heraus, jedoch konnten flavonoidähnliche Fraktionen detektiert werden, deren Gruppenzugehörigkeit bei der Auswahl der Flavonoide für die Gewächshausversuche ausschlaggebend war. Für eine genauere Identifizierung der betreffenden Fraktionen wäre der Einsatz zusätzlicher Methoden, beispielsweise die Massenspektroskopie, sehr nützlich. Um die physiologische Bedeutung der Exsudation der detektierten phenolischen Substanzen für die Interaktion zwischen Pflanze-Antagonist und Pflanze-Pathogen zu bewerten, wäre es sinnvoll, die einzelnen Fraktionen getrennt in Agarplattentests oder in Wachstumstests mit Antagonist oder auch Pathogen einzusetzen. Interessant wäre hier vor allem die Untersuchung der in allen Proben vorhandenen Hauptfraktion und der isoflavonoidähnlichen Fraktion aus den Proben mit *Pythium*. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten über die Wurzelexsudate von Gurkenpflanzen im Zusammenhang mit dem Einfluß von Pathogen und Antagonist ermöglichen somit die Bearbeitung weiterer wichtiger Fragestellungen zur Aufklärung jener Mechanismen, die für die Krankheitsunterdrückung ausschlaggebend sind.

5 Zusammenfassung

Im Bereich des biologischen Pflanzenschutzes gegen bodenbürtige Phytopathogene bieten antagonistische Bakterien aus der Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden vielversprechende Ansatzpunkte, da insbesondere bei der Bekämpfung von Pathogenen im Boden eine chemische Bekämpfung umwelttoxikologisch bedenklich und der Zeitraum der Wirksamkeit solcher Mittel im Boden begrenzt ist.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Methoden zur Prüfung und Verbesserung der Wirksamkeit von fluoreszierenden Pseudomonaden beim Einsatz im Unterglasanbau von Gurken gegen den Schaderreger *Pythium ultimum*. Dabei war die Entwicklung eines geeigneten, praxisnahen und aussagekräftigen Pflanzentestsystems, bei dem eine hohe Reproduzierbarkeit des Befalls der Pflanzen und eine effektive Einbringung der zu prüfenden, potentiellen Antagonisten sichergestellt war, ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Ein anderer Schwerpunkt bestand in der Untersuchung des Einflusses von Flavonoiden auf die Wirksamkeit eines ausgewählten *Pseudomonas fluorescens*-Isolates im Hinblick auf die Gewährleistung einer hohen Wirkungssicherheit. Anhand von Besiedelungsstudien, Wurzelexsudatanalysen und Wachstumsexperimenten wurde außerdem versucht, die Interaktionen zwischen dem Pathogen, den Pseudomonaden und der Testpflanze Gurke besser zu verstehen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden das Ziel verfolgt, reproduzierbare Infektionen an Gurken zu erzeugen und eine Saatgutbehandlungsmethode zu entwickeln, mit der die Pseudomonaden effektiv an ihren späteren Wirkort, den keimenden Samen, gebracht werden können. Zu diesem Zweck wurde zunächst das in der Arbeit zu verwendende Pathogen näher bestimmt. Durch die Anfertigung und Auswertung lichtmikroskopischer Präparate der Fortpflanzungsstrukturen konnte das Isolat als *Pythium ultimum* var. *ultimum* determiniert werden. Dieses Ergebnis wurde durch die parallel durchgeführte Restriktionsfragmentlängen-Analyse der Internal Transcribed Spacers der rDNA des Isolates bestätigt. Durch die Verwendung eines genau definierten *Pythium*-Inokulums konnte nach Festlegung einer Bodenwasserkapazität von 60% der WK_{max} ein in hohem Maße reproduzierbarer Befall der Gurkenpflanzen hervorgerufen werden. Dies war jedoch nur dann möglich, wenn direkt im Anschluß an die Bodeninokulation mit den infektiösen Einheiten des Pathogens die Aussaat der Gurken erfolgte. Erfolgte die Aussaat später, so überlebten nur wenige oder gar keine Pflanzen. Für die künstliche Verseuchung des Bodens in dem zu entwickelnden Pflanzentestsystem konnte somit eine geeignete *Pythium*-Inokulummenge von 0,25g FG/320g Bodensubstrat festgelegt werden. Diese Inokulummenge reduzierte die Auflaufraten der Gurken in den Kontrollen mit *Pythium* auf 20-25%.

Für die Wirkungsprüfung der Pseudomonaden im Pflanzentestsystem wurde mittels Rückisolierungsexperimenten eine effektive Methode der Saatgutbehandlung mit Gummi Arabicum festgelegt, die gewährleistete, daß sich in jeder Samenkruste mindestens 10^6 bis 10^7 lebende Zellen des jeweiligen Bakteriums befanden. Dieses Verfahren zur Saatgutinkrustierung mit Pseudomonaden wurde hinsichtlich der Sterilisation, der zu verwendenden Samenmenge und der Behandlungsdauer optimiert.

Bei der Anwendung des Pflanzen-Pathogen-Antagonisten-Testsystems stellte sich *Pseudomonas fluorescens* W24 – ein aus Hohenheim stammendes Isolat – als hochwirksam gegen *Pythium* heraus. Zwei für ihre Wirksamkeit bekannten Referenzstämme (*Pseudomonas putida* II 232 und *Pseudomonas chlororaphis* I 112) zeigten in diesem, der Arbeit zugrundeliegenden Testsystem ebenfalls ein ähnlich hohes antagonistisches Potential. Die untersuchten Stämme *Pseudomonas fluorescens* W5 und W34 hatten *ad planta* keine befallsmindernde Wirkung. Durch die Saatgutbehandlung mit *Pseudomonas putida* II 232 konnte der latente Befall der Pflanzen vermindert werden, was anhand des erhöhten Trockengewichts der Wurzeln gezeigt werden konnte.

Versuche zur Untersuchung des Einflusses von Flavonoiden am Beispiel von *Pseudomonas fluorescens* W34 zeigten, daß die Wirkung des Isolates *ad planta* in Kombination mit Luteolin-7-Glucosid bzw. Daidzein signifikant verbessert werden konnte, wobei die Wahl der Konzentration entscheidend war.

Um einige der den beobachteten Wirkungen der Pseudomonaden im Pflanzen-Pathogen-Test zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären, wurde im zweiten Teil der Arbeit das Besiedelungsvermögen der Pseudomonaden mit Hilfe von Rückisolierungen und raster-elektronenmikroskopischen Untersuchungen bewertet. Dabei zeigte sich, daß sich die verschiedenen *Pseudomonas*-Isolate hinsichtlich ihres Adhäsionsvermögens an Samen- und Wurzeloberfläche von Gurken nicht unterscheiden ließen. Allerdings stellte sich der Stamm *Pseudomonas fluorescens* W24 als aktivster Wurzelbesiedler heraus, wenn die Pseudomonaden vor dem Auskeimen der Wurzel in eine Samenkruste aus Gummi Arabicum eingebettet worden waren. Die Rückisolierungsexperimente wiesen auch auf eine Vermehrung dieses Isolates auf der wachsenden Keimlingswurzel hin. Die untersuchten Isolate *Pseudomonas fluorescens* W34 und W5 konnten die Gurkenwurzeln ebenfalls besiedeln, hatten aber geringere Vermehrungsraten während des Wurzelwachstums. Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten keine Unterschiede im Besiedelungsvermögen der Stämme W24 und W34 festgestellt werden; beide bildeten Mikrokolonien entlang der Wurzel, deren Häufigkeit zur Wurzelspitze hin abnahm.

Bei der Analyse der Wurzelexsudate unterschiedlich behandelter Keimlinge war eine Identifikation von Flavonoiden nicht möglich, jedoch konnten einige Substanzen detektiert werden, die zwar nur in geringen Mengen vorlagen, aber flavonoidähnliche UV-Absorptionsspektren aufwiesen. Es konnte gezeigt werden, daß mittels HPLC wesentlich mehr phenolische Substanzen im Exsudat aufgetrennt werden können als durch Anwendung der HPTLC. Die Methode der HPLC erwies sich jedoch in bezug auf eine Identifikation der Substanzen als nicht ausreichend.

Durch die Wachstumsexperimente an Fermenterkulturen unter standardisierten Bedingungen konnte kein Einfluß des *ad planta* wirksamen Luteolin-7-Glucosids auf *Pseudomonas fluorescens* W34 (in Mineralmedium bei einem Sauerstoffgehalt von 80%) beobachtet werden. Es konnte also nicht geklärt werden, ob die Flavonoide möglicherweise über die Förderung des Bakterienwachstums im Boden wirken. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Prozeßoptimierungen bei der Fermentation wurden jedoch die Voraussetzungen dafür geschaffen, die relevanten Fermentationsparameter in Zukunft gezielt

verändern zu können, um zum Beispiel auch unter Bedingungen arbeiten zu können, die denen der Rhizosphäre ähnlich sind.

Insgesamt lassen sich durch die *in vitro*-Untersuchungen die Antagonisten und ihre Fähigkeiten bezüglich einer *ad planta*-Anwendung genauer charakterisieren. Die in dieser Arbeit entwickelte Methodik erlaubt die Prüfung der antagonistischen Wirkung von Bakterien gegenüber *Pythium ultimum* in einem praxisnahen Pflanzentestsystem, welches sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit auszeichnet. Auf der Grundlage dieses Testsystems kann die Bedeutung von Bodenzusätzen wie beispielsweise Flavonoiden als Mittel zur Verbesserung der Wirkungssicherheit von Antagonisten bewertet werden.

6 Literaturverzeichnis

- Adler, I., Diekmann, J., Hartke, W., Hecht, V., Rohn, F., Schügerl, K.** (1980) Bubble coalescence behaviour in biological media, II. Effect of antifoam additives. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 171-186.
- Agnihotri, V.P., Vaartaja, O.** (1967) Root exudate from pine seedlings and their affects on *Pythium ultimum*. *Can. J. Bot.* **45**: 1031-1040.
- Agrios, G.N.** (1988) „Plant Pathology“. Academic Press, San Diego, New York.
- Aguilar, J.M.M., Ashby, A.M., Richards, A.J.M., Loake, G.J., Watson, M.D., Shaw, C.H.** (1988) Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2741-2746.
- Alabouvette C.** (1990) Biological control of Fusarium wilt pathogens in suppressive soils. In: Hornby, D. (Ed.) „Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens“, S. 27-44, CAB International, Wallingford.
- Anderson, A.J., Habibzadegah-Tari, P., Tepper, C.S.** (1988) Molecular studies on the role of the root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 375-380.
- Araújo, M.A.V., Mendonça-Hagler, L.C., Hagler, A.N., van Elsas, J.D.** (1996) Selection of rhizosphere-competent *Pseudomonas* strains as biocontrol agents in tropical soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 589-593.
- Arndt, W., Kolle, C., Buchenauer, H.** (1998) Effectiveness of fluorescent pseudomonads on cucumber and tomato plants under practical conditions and preliminary studies on the mode of action of the antagonists. *J. Plant Dis. Prot.* **105**: 198-215.
- Ayers, W.A., Lumsden, R.D.** (1975) Factors affecting production and germination of oospores of three *Pythium* species. *Phytopathology* **65**: 1094-1100.
- Baker, K.F.** (1987): Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathology* **25**: 67-85.
- Bandoni, R.J.** (1979) Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia* **71**: 873- 874.
- Barr, D.J.S.** (1992) Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia* **84**: 1-11.
- Bartnicki-Garcia, S.** (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiology* **22**: 87-108.
- Barz, W., Adamek, C., Berlin, J** (1970) The degradation of formononetin and daidzein in *Cicer arietinum* and *Phaseolus aureus*. *Phytochem.* **9**: 1735-1744.
- Becker, J.O., Schwinn, F.J.** (1993) Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pestic. Sci.* **37**: 355-363.
- Becker, J.O., Cook, R.J.** (1988) Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* **78**: 778-782,
- Beever, R.E., Bollard, E.G.** (1970) The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. *J. Gen. Microbiol* **60**: 273-297.

- Benizri, E., Schoeny, A., Picard, C., Courtade, A., Guckert, A.** (1997) External and internal root colonization of maize by two *Pseudomonas* strains: enumeration by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Curr. Microbiol.* **34**: 297-302.
- Brennerova, M.V., Crowley, D.E.** (1994) Direct detection of rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* sp. using an *Escherichia coli* rRNA promoter in a Tn7-lux system. *FEMS Microbiol. Ecology* **14**: 319-330.
- Brown, M.E.** (1974) Seed and root bacterization. *Ann. Rev. Phytopathol.* **12**: 181-197.
- Brown, M.N., Beringer, J.E.** (1983) The potential of antagonists for fungal control. *Agriculture, Ecosystems and Environm.* **10**: 127-141.
- Bull, C.T., Weller, D.M., Thomashow, L.S.** (1991) Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology* **81**: 954-959.
- Callan, N.W., Mathre, D.E., Miller, J.B.** (1990) Biopriming-seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* preemergence damping-off in *sh2* sweet corn. *Plant Dis.* **74**: 368-372.
- Campbell, R.** (1986) The search for biological control agents against plant pathogens: a pragmatic approach. *Biol. Agric. Horticulture* **3**: 317-327.
- Chao, W.L., Nelson, E.B., Harman, G.E., Hoch, H.C.** (1986) Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology* **76**: 60-65.
- Chen, M., Alexander, M.** (1973) Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 213-221.
- Chen, W., Hoy, J.W., Schneider, R.W.** (1992) Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. *Exp. Mycology* **16**: 22-34.
- Chet, I., Harman, G.E., Baker, R.** (1981) *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microb. Ecol.* **7**: 29-38.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., de Priester, W., van der Bij, A.J., Lugtenberg, B.J.J.** (1997) Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 79-86.
- Colbert, S.F., Schroth, M.N., Weinhold, A.R., Hendson, M.** (1993a) Enhancement of population densities of *Pseudomonas putida* PpG7 in agricultural ecosystems by selective feeding with the carbon source salicylate. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2064-2070.
- Colbert, S.F., Isakeit, T., Ferri, M., Weinhold, A.R., Hendson, M., Schroth, M.N.** (1993b) Use of exotic carbon source to selectively increase metabolic activity and growth of *Pseudomonas putida* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2056-2063.
- Cook, R.J., Baker, K.F.** (1983) „The nature and practice of biological control of plant pathogens“. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Cruz de la, A.R., Poplawsky, A.R., Wiese, M.V.** (1992) Biological suppression of potato ring rot by fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1986-1991.
- Curl, E.A., Truelove, B.** (1986) „The Rhizosphere“. Springer-Verlag, Berlin.
- D’Arcy-Lameta, A.** (1986) Study of soybean and lentil root exudates. II. Identification of some polyphenolic compounds, relation with plantlet physiology. *Plant Soil* **92**: 113-123.

- D'Arcy-Lameta, A., Jay, M.** (1987) Study of soybean and lentil root exudates. III. Influence of soybean isoflavonoids on the growth of rhizobia and some rhizospheric microorganisms. *Plant Soil* **101**: 267-272.
- Dandurand, L.M., Schotzko, D.J., Knudsen, G.R.** (1997) Spatial patterns of rhizoplane populations of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3211-3217.
- Davies, K.G., Whitbread, R.** (1989) Factors affecting the colonisation of a root system by fluorescent pseudomonads: The effect of water, temperature and soil microflora. *Plant Soil* **116**: 247-256.
- Défago, G., Haas, D.** (1990) Pseudomonads as antagonists of soilborne plant pathogens: modes of action and genetic analysis. In : Bollag, J.-M., Stotzky, G. (Ed.) „Soil Biochemistry“, Marcel Dekker, New York, S. 249-291.
- Défago, G., Berling, C.H., Burger, U., Haas, D., Kahr, G., Keel, C., Voisard, C., Wirthner, P., Wüthrich, B.** (1990) Suppression of black root rot of tobacco and other root diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*: potential applications and mechanisms. In: Hornby, D. (Ed.), „Biological control of soil-borne plant pathogens“, S. 93-108, CAB International, Wallingford.
- De Leij, F.A.A.M., Lynch, J.M.** (1997) Functional diversity in the rhizosphere. *Proc. 4th Internat. Workshop on PGPR*, Sapporo, Japan, S. 38-43.
- De Mot, R., Veulemans, B., Vanderleyen, J.** (1991) Root adhesive protein of *Pseudomonas fluorescens* OE 283. In: Keel, C., Koller, B., Defago, G. (Ed.) „Plant growth-promoting rhizobacteria - progress and prospects“. *Proc. of the 2th Int. Workshop on PGPR*. WPRS Bulletin XIV/8, S. 308-312.
- De Weger, L.A., Jann, B., Jann, K., Lugtenberg, B.J.J.** (1987) Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* spp. that stimulate plant growth: composition and use for strain identification. *J. Bacteriol.* **169**: 1441-1446.
- De Weger, L.A.** (1988) Role of the bacterial cell surface in potato growth-stimulation by fluorescent *Pseudomonas* bacteria. Dissertation der Universität Leiden, Niederlande.
- De Weger, L.A., Dunbar, P., Walter, F.M., Lugtenberg, B.J.J., Sayler, G.S.** (1991) Use of bioluminescence markers to detect *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3641-3644.
- Dick, M.W.** (1990) „Key to *Pythium*“. University of Reading Press, Reading, U.K.
- Di Pietro, A., Gut-Rella, M., Pachlatko, J.P., Schwinn, F.J.** (1992) Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. *Phytopathology* **82**: 131-135.
- Drahos, D.J., Hemming, B.C., McPherson, T.** (1986) Tracking recombinant organisms in the environment: β -galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonads. *Biotechnology* **4**: 439-444.
- Ebel, J.** (1986) Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 235-264.
- Ehle, H., Grimm, H., Kütke, K., Prillwitz, H.-G., Thiede, H.** (1981) Richtlinie für die Prüfung von Beizmitteln einschließlich pilliertem Saatgut gegen Auflaufkrankheiten an Rüben. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtsch., Braunschweig, 4-1.3.1.
- Elsherif, M., Grossman, F.** (1990) Effects of different cropping systems on the occurrence of fluorescent pseudomonads. *J. Phytopathology* **130**: 65-81.

- Emerson, R.W., Crandall, B.G.** (1996) Use of flavonoid aldehydes as pesticides. International Publication Number WO 96/20596.
- Feder, I.S.** (1997) Anwendung und Charakterisierung einer stammspezifischen DNA-Sonde zur Detektion und Quantifizierung von antagonistisch wirksamen *Pseudomonas fluorescens* Stämmen in der Rhizosphäre von *Cucumis sativus* var. Delikateß. Diplomarbeit Universität Marburg.
- Foster, R.C.** (1986) The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 211-234.
- Förster, H., Coffey M.D., Elwood, H., Sogin, M.L.** (1990) Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA's of three zoosporic fungi and implication for fungal evolution. *Mycologia* **82**: 306-312.
- Fravel, D.R., Marois, J.J., Lumsden, R.D., Connick, W.J.** (1985) Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology* **75**: 774-777.
- Fravel, D.R.** (1988) Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**: 75-91.
- Fukui, R., Campbell, G.S., Cook R.J.** (1994) Factors influencing the incidence of embryo infection by *Pythium* spp. during germination of wheat seeds in soils. *Phytopathology* **84**: 695-702.
- Gamliel, A., Katan, J.** (1992a) Influence of seed and root exudates on fluorescent pseudomonads and fungi in solarized soil. *Phytopathology* **82**: 320-327.
- Gamliel, A., Katan, J.** (1992b) Chemotaxis of fluorescent pseudomonads towards seed exudates and germinating seeds in solarized soil. *Phytopathology* **82**: 328-332.
- Garland, C.D., Lee, A., Dickson, M.R.** (1979) The preservation of surface associated microorganisms prepared for scanning electron microscopy. *J. Microsc. Oxford* **116**: 227-242.
- Geels, F.P., Schippers, B.** (1983) Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp.. *Phytopath. Z.* **108**: 207-214.
- Giannasi, D.E.** (1988) Flavonoids and evolution in the dicotyledons. In: Harborne, J.B. (Ed.) „The Flavonoids“, S. 479-504, Chapman and Hall, London, New York.
- Glandorf, D.C.M., van der Sluis, I., Anderson, A.J., Bakker, P.A.H.M., Schippers, B.** (1994) Agglutination, adherence and root colonization by fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1726-1733.
- Golovleva, L.A., Maltseva, O.V., Solyanikova, I.P.** (1992) Metabolism of foreign compounds in *Pseudomonas* spp. In: „*Pseudomonas*: Molecular Biology and Biotechnology“, S. 231-238, Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.
- Grove, S.N., Bracker, C.E.** (1978) Protoplasmic changes during zoospore encystment and cyst germination in *Pythium aphanidermatum*. *Exp. Mycol.* **2**: 51-98.
- Gubler, F., Hardham, A.R., Duniec, J.** (1989) Characterising adhesiveness of *Phytophthora cinnamomi* zoospores during encystment. *Protoplasma* **149**: 24-30.
- Gunderson, J.H., Elwood, H., Ingold, A., Kindle K, Sogin M.L.** (1987) Phylogenetic relationships between Chlorophytes, Chrysophytes and Oomycetes. *Proc. Natl. Acad. USA* **84**: 5823-5827.

- Hadar, Y., Harman, G.E., Taylor, A., Norton, J.M.** (1983) Effects of pre-germination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. *Phytopathology* **73**: 1322-1325.
- Handelsman, J., Staab, E.V.** (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* **8**: 1855-1869.
- Harborne, J.B.** (1988) „The flavonoids“, Chapman and Hall, London, New York.
- Harborne, J.B., Swain, T.** (1969) „Perspectives in Phytochemistry“, Vol. 1, Academic Press, London.
- Harman, G.E., Hadar, Y.** (1983) Biological control of *Pythium* species. *Seed Sci. Technol.* **11**: 893-906.
- Harman, G.E., Chet, I., Baker, R.** (1980) *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **70**: 1167-1172.
- Hartwig, U.A., Joseph, C.M., Phillips, D.A.** (1991) Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **95**: 797-803.
- Haskins, R.H., Tulloch, A.P., Micetich, R.G.** (1964) Steroids and the stimulation of sexual reproduction of a species of *Pythium*. *Can. J. Microbiol.* **10**: 187-195.
- Helal, H.M., Sauerbeck, D.** (1986) Effect of plant roots on carbon metabolism of soil microbial biomass. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **149**: 181-188.
- Hendrix, F.F., Campbell, W.A.** (1973) Pythiums as plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **11**: 77-98.
- Hendrix, J.W.** (1974) Physiology and biochemistry of growth and reproduction in *Pythium*. *Proc. Am. Phytopathol. Soc.* **1**: 207-210.
- Hendrix, F.F., Papa, K.E.** (1974) Taxonomy and genetics of *Pythium*. *Proc. Amer. Phytopath. Soc.* **1**: 200-207.
- Hering, O.** (1997) Charakterisierung und Differenzierung bei *Fusarium* Link mittels RAPD und ITS-RFLP, *Mittlung der BBA für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*, Nr. 331.
- Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G.W.** (1983) „Naturally occurring isoflavonoids“, Springer Verlag, Wien, New York.
- Höflich, G.** (1989) Saatgutpillierung mit organischen Substanzen zur Beeinflussung der Mikroorganismenbesiedelung und Jugendentwicklung von Weizen. *Zentralbl. Mikrobiol.* **144**: 59-63.
- Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K., Tiedje, J.M.** (1988) DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 703-711.
- Hornby, D.** (1983) Suppressive soils. *Ann. Rev. Phytopathol.* **21**: 65-85.
- Howell, C.R.** (1991) Biological control of *Pythium* damping-off of cotton with seed-coating preparations of *Gliocladium virens*. *Phytopathology* **81**: 738-741.
- Howell, C.R., Stipanovic, R.D.** (1980) Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* **70**: 712-715.

- Howell, C.R., Beier, R.C., Stipanovic, R.D.** (1988) Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology* **78**: 1075-1078.
- Howie, W., Suslow, T.V.** (1986) Effect of antifungal compound biosynthesis on cotton root colonization and *Pythium* suppression by a strain of *Pseudomonas fluorescens* and its antifungal minus isogenic mutant. *Phytopathology* **76**: 1069.
- Hu, S., Coleman, D.C., Hendrix, P.F., Beare, M.H.** (1995) Biotic manipulation effects on soil carbohydrates and microbial biomass in an cultivated soil. *Soil. Biol. Biochem.* **27**: 1127-1135.
- Hubac, C., Ferran, J., Guerrier, D., Trémolières, A., Kondorosi, A.** (1993) Luteolin absorption in *Rhizobium meliloti* wild type and mutant strains. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1571-1578.
- Hwang, S.F., Chang, K.F., Howard, R.J., Deneka, B.A., Turnbull, G.D.** (1996) Decrease in incidence of *Pythium* damping-off of field pea by seed treatment with *Bacillus* spp. and metalaxyl. *J. Plant Dis. Prot.* **103**: 31-41.
- Ingold, C.T., Hudson, H.J.** (1993) „The biology of fungi“. Chapman and Hall, London, New York.
- James, D.W., Suslow, T.V., Steinback, K.E.** (1985) Relationship between rapid, firm adhesion and long-term colonization of roots by bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 392-397.
- Jones, R.W., Pettit, R.E., Taber, R.A.** (1984) Lignite and stillage: carrier and substrate for application of fungal biocontrol agents to soil. *Phytopathology* **74**: 1167-1170.
- Junga, J.** (1997) Wirksamkeit von *Bacillus subtilis* als Antagonist im Pflanzen-Pathogen-System *Cucumis sativus*-*Pythium ultimum* sowie Wechselwirkungen mit Flavonoiden. Diplomarbeit Universität Marburg.
- Kaiser, W.J., Hannan, R.M.** (1983) Etiology and control of seed decay and preemergence damping-off of chickpea by *Pythium ultimum*. *Plant Dis.* **67**: 77-81.
- Kaiser, W.J., Hannan, R.M., Weller, D.M.** (1989) Biocontrol of seed rot and preemergence damping-off of chickpea with fluorescent pseudomonads. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 269-273.
- Keel, C., Wirthner, P., Oberhänsli, T., Voisard, C., Haas, D., Défago, G.** (1990) Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: Role of the antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis* **9**: 327-341.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E.** (1954) Two simple media for the demonstration of pycocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**: 301-307.
- Kloepper, J.W.** (1991) Development of in vivo assays for prescreening antagonists of *Rhizoctonia solani* in cotton. *Phytopathology* **81**: 1006-1013.
- Kloepper, J.W., Beauchamp, C.J.** (1992) A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* **38**: 1219-1232.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N.** (1981) Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology* **71**: 590-592.
- Koch, E.** (1997) Screening of rhizobacteria for antagonistic activity against *Pythium ultimum* on cucumber and kale. *J. Plant Dis. Prot.* **104**: 353-361.

- Kohn, L.M., Petsche, D.M., Bailey S.R., Novak, L.A., Anderson, J.B.** (1989) Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* **78**: 1047-1051.
- Kraft, J.M.** (1974) The influence of seedling exudates on the resistance of peas to Fusarium and Pythium root rot. *Phytopathology* **64**: 190-193.
- Kraus, J., Loper, J.E.** (1991) Biocontrol of Pythium damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Mechanistic studies. In: Keel, C., Koller, B., Défago, G. (Eds.) „Plant growth-promoting rhizobacteria – progress and prospects“, S. 172-176, WPRS Bulletin XIV/8.
- Kreisel, H., Schauer, F.** (1987) „Methoden des mykologischen Laboratoriums“, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Lancaster, M.E.** (1997) „A newsletter for commercial vegetable growers“, Vol. 3, Issue 4, Internet: <http://henderson.ces.state.nc.us>.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F., Lemanceau, P.** (1996) The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2449-2456.
- Lee, S. B., Taylor, J. W.** (1990) Isolation of DNA from fungal mycelia and single cells. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, (Eds.) „PCR Protocols, a guide to methods and applications“, S. 282-287, Academic Press, San Diego.
- Lenck, W.** (1995) Untersuchungen zur Interaktion von *Pythium* und *Bacillus subtilis* *in vitro* und *in vivo* an Tomatenkeimlingen. Diplomarbeit, Universität Marburg.
- Lewis, J.A., Papavizas, G.C.** (1987) Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathol.* **36**: 438-446.
- Liddell, C.M., Parke, J.L.** (1989) Enhanced colonization of pea taproots by fluorescent pseudomonad biocontrol agent by water infiltration into soil. *Phytopathology* **79**: 1327-1332.
- Lifshitz, R., Windham, M.T., Baker, R.** (1986) Mechanisms of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **76**: 720-725.
- Lifshitz, R., Kloepper, J.W., Kozlowski, M.** (1987) Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.* **33**: 390-395.
- Loake, G.J., Ashby, A.M., Shaw, C.H.** (1988) Attraction of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 towards sugars involves a highly sensitive chemotaxis system. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1427-1432.
- Loper, J. E.** (1988) Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* **78**: 166-172.
- Loper, J.E., Haack, C., Schroth, M.N.** (1985) Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 416-422.
- Lugtenberg, B.J.J., de Weger, L.A., Bennett, J.W.** (1991) Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Current Opinion Biotech.* **2**: 457-464.
- Lumsden, R.D., Carter, J.P., Whipps, J.M., Lynch, J.M.** (1990) Comparison of biomass and viable propagule measurements in the antagonism of *Trichoderma harzianum* against *Pythium ultimum*. *Soil. Biol. Biochem.* **22**: 187-194.

- Lynch, J.M.** (1990) Introduction: Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: Lynch, J. M. (ed.): „The Rhizosphere“, S. 1–10, Wiley, New York.
- Lynch, J.M., Whipps, J.M.** (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **129**: 1-10.
- Lynch, J.M., Lumsden, R.D., Atkey, P. T., Ousley, M.A.** (1991) Prospects for control of *Pythium* damping-off of lettuce with *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Enterobacter* spp. *Biol. Fertil. Soils* **12**: 95-99.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B.** (1970) „Systematic identification of flavonoids“, Springer Verlag, New York.
- Markham, K.R.** (1982) „Techniques of flavonoid identification“, Academic Press, London, New York.
- Martin, F.N., Hancock, J.G.** (1987) The use of *Pythium oligandrum* for biological control of premergence damping-off caused by *P. ultimum*. *Phytopathology* **77**: 1013-1020.
- Martyn, R.D., Miller, M.E., Bruton, B.B.** (1993) APSnet, Internet: <http://www.scisoc.org/-resource/common/names/cucurbit.htm>.
- Moore, E.R.B., Mau, M., Arnscheidt, A., Van de Peer, Y., de Wachter, R., Collins, M.D., Boettger, E.C., Timmis, K.N.** (1996) Determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of intrageneric relationships. *System. Appl. Microbiol.* **19**: 478-492.
- Müller, K.** (1995) Charakterisierung und Identifizierung antagonistischer *Pseudomonas* Stämme im System *Pythium* sp./*Cucumis sativus*. Diplomarbeit, Universität Marburg.
- Nelson, E.B.** (1987) Rapid germination of sporangia of *Pythium* species in response to volatiles from germinating seeds. *Phytopathology* **77**: 1108-1112.
- Nelson, E.B.** (1988) Biological control of *Pythium* seed rot and pre-emergence damping-off of cotton with *Enterobacter cloacae* and *Erwinia herbicola* as seed treatments. *Plant Dis.* **72**: 140-142.
- Nelson, E.B.** (1990) Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant Soil* **129**: 61-73.
- Nelson, E.B., Hsu, J.S.T.** (1994) Nutritional factors affecting responses of sporangia of *Pythium ultimum* to germination stimulants. *Phytopathology* **84**: 677-683.
- O’Sullivan, D.J., O’Gara, F.** (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **65**: 662-676.
- Palleroni, N.J.** (1984) Pseudomonadaceae. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.) „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology“, S. 140-219. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Parke, J.L., Moen, R., Rovira, A.D., Bowen, G.D.** (1986) Soil water flow affects the rhizosphere distribution of a seed-borne biological control agent, *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 583-588.
- Paulitz, T.C., Baker, R.** (1987) Biological control of *Pythium* damping-off of cucumbers with *Pythium nunn*: Population dynamics and diseases suppression. *Phytopathology* **77**: 335-340.
- Paulitz, T.C., Loper, J.E.** (1991) Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology* **81**: 930-935.
- Philipp, W.-D.** (1988) „Biologische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten“, Verlag E. Ulmer, Stuttgart.

- Phillips, D.A., Tsai, S.M.** (1992) Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbes. *Mycorrhiza* **1**: 55-58, 1992.
- Preisig, H.R.** (1989) The flagellar base ultrastructure and phylogeny of chromophytes. In: J.C. Green, B.S.C. Leadbeater, W.L. Diver. (Eds.) „The chromophyte algae: problems and perspectives“, S. 167-187, Systematics Association Special, Vol. No. 38. Clarendon Press, Oxford.
- Rao, J.R., Cooper, J.E.** (1994) Rhizobia catabolize *nod* gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. *J. Bacteriol.* **176**: 5409-5413.
- Rankin, L., Paulitz, T.C.** (1994) Evaluation of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium* root rot of greenhouse cucumbers in hydroponic culture. *Plant Dis.* **78**: 447-451.
- Recourt, K., Schripsema, J., Kijne, J.W., van Brussel, A.A.N., Lugtenberg, B.J.J.** (1991) Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* results in release of nod gene activating flavanones and chalcones. *Plant Mol. Biol.* **16**: 841-852.
- Redecker, D.** (1995) Entwicklung und Anwendung einer molekularbiologischen Identifikationsmethode für Pilze der arbuskulären Endomycorrhiza. Dissertation Universität Marburg.
- Redecker, D., Batinic, T., Feder, I.S., Kosch, K., Schulz, U.M., Vinuesa-Fleischmann, P., Werner, D.** (in Vorb.) Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* W34: specific detection and quantification in the rhizosphere of *Cucumis sativus* with a DNA probe and characterization by DNA fingerprinting.
- Rovira, A.D.** (1985) Manipulation of the rhizosphere microflora to increase plant production. *Rev. Rural Science* **6**: 185-187.
- Robinson, D.G., Ehlers, U., Herken, R., Herrmann, B., Mayer, F., Schürmann F.-W.** (1987) „Methods of preparation for electron microscopy“. Springer-Verlag, Berlin.
- Scher, F.M., Kloepper, J.W., Singleton, C.A.** (1985) Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates *in vitro* and in soil. *Can. J. Microbiol.* **31**: 570-574.
- Scher, F.M., Kloepper, J.W., Singleton, C.A., Zaleska, Laliberte, I.M.** (1988) Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: relationship to bacterial motility, chemotaxis, and generation time. *Phytopathology* **78**: 1055-159.
- Scher, F.M., Kloepper, J.W., Singleton, C.A.** (1985) Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates *in vitro* and in soil. *Can. J. Microbiol.* **31**: 570-574.
- Schippers, B.** (1983) Prospects of biological control of plant pathogens with fluorescent *Pseudomonas* spp. *Proc. 10th. Int. Congr. Plant Prot.*, S. 767-771.
- Schippers, B., Bakker, A.W., Bakker, P.A.H.M.** (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**: 339-358.
- Schlösser, E.** (1983) „Allgemeine Phytopathologie“, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Schmitthenner, A.F.** (1962) Isolation of *Pythium* from soil particles. *Phytopathology* **52**: 1133-1138.
- Schneider, R.W.** (1982) „Suppressive Soils and Plant Disease“, *Am. Phytopath. Soc.*, St. Paul, Minn.
- Schroth, M.N., Hancock, J.G.** (1981) Selected topics in biological control. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**: 453-476.

- Schroth, M.N., Hancock, J.G.** (1982) Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* **216**: 1376-1381.
- Schroth, M.N., Weinhold, A.R.** (1986) Root-colonizing bacteria and plant health. *Hort. Science* **21**: 1295-1298.
- Schulz, E., Engle, F.E., Wood, J.M.** (1972) New oxygenase in the degradation of the Flavones and Flavanones by *Pseudomonas putida*. *Biochem.* **13**: 1768-1776.
- Singh, R.S.** (1965) Development of *Pythium ultimum* in soil in relation to presence and germination of seeds of different crops. *Mycopath. Mycol.* **27**: 155.160.
- Stanghellini, M.E.** (1974) Spore germination, growth and survival of *Pythium* in soil. *Proc. Am. Phytopath. Soc.* **1**: 211-214.
- Stanghellini, M.E., Burr, T.J.** (1973) Effect of soil water potential on disease incidence and oospore germination of *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology* **63**: 1469-1498.
- Stanghellini M.E., Hancock, J.G.** (1971) Radial extent of the bean spermosphere and its relation to the behaviour of *Pythium ultimum*. *Phytopathology* **61**: 165-168.
- Storhas, W.** (1994) „Bioreaktoren und periphere Einrichtungen“, Vieweg Verlag, Braunschweig.
- Suslow, T.V., Kloepper, J.W., Schroth, M.N., Burr, T.J.** (1979) Beneficial bacteria enhance plant growth. *Calif. Agric.* **33**: 15-17.
- Suslow, T.V., Schroth, M.N.** (1982) Rhizobacteria of sugar beets: effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* **72**: 199-206.
- Tari, P.H., Anderson, A.J.** (1988) Fusarium wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2037-2041.
- Törmälä, T.** (1995) Economics of biocontrol agents: an industrial view. In: Hokkanen, H.M.T., Lynch, J.M. (Eds.) „Biological control: benefits and risks“, S. 277-283, University Press, Cambridge
- Thomashow, L.S., Mavrodi, D.V.** (1997) The genetics and regulation of antibiotic production by PGPR. *Proc. 4th Internat. Workshop on PGPR*, Sapporo, Japan, S. 108-115.
- Vancanneyt, M., Torck, U., Dewettinck, D., Vaerewijck, M., Kersters, K.** (1996) Grouping of pseudomonads by SDS-PAGE of whole-cell proteins. *System. Appl. Microbiol.* **19**: 556-568.
- Vancura, V., Hovadik, A.** (1965) Composition of root exudates in the course of plant development, S. 21-25. In: Macura, J., Vancura, V. (Ed.) „Plant Microbes Relationships“, Czech. Acad. Sci.
- Van der Plaats-Niterink, A.J.** (1981) „Monograph of the genus *Pythium*“, Studies in Mycology No. 21, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, Institute of the Royal Netherlands.
- Vandijk, K., Nelson, E.B.** (1991) Inactivation of seed exudate stimulants of *Pythium ultimum* sporangium germination by biocontrol strains of *Enterobacter cloacae* and other seed-associated bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 183-192.
- Vesper, S.J.** (1987) Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1397-1405.
- Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J., Werner D.** (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of genes encoding 16S

rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive Extragenic Palindromic PCR Genomic Fingerprinting and Partial 16S rDNA Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2096-2104.

Vogt, W., Buchenauer, H. (1997) Enhancement of biological control by combination of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* strains and resistance inducers against damping off and powdery mildew in cucumber. *J. Plant Dis. Prot.* **104**: 272-280.

Vogt, W. (1994) Untersuchungen zum Einfluß von Mikroorganismen, insbesondere fluoreszierender Pseudomonaden, auf den Wuchs und Befall von Gurken durch *Pythium* und *Rhizoctonia*. Diplomarbeit, Universität Braunschweig.

Wang, P.H., White, J.G. (1997) Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the Internal Transcribed Spacer Region of ribosomal DNA. *Physiol. and Molec. Plant Pathology* **51**: 129-143.

Wei, D., Kloepper, J.W., Tuzun, S. (1996) Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* **82**: 221-224.

Weller, D.M., Thomashow, L.S., Cook, R.J. (1995) Biological control of soil-borne pathogens of wheat: benefits, risks and current challenges. In: Hokkanen, H.M.T., Lynch, J.M. (Eds.) „Biological control: benefits and risks“, S. 149-160, University Press, Cambridge.

Weller, D.M. (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev Phytopathol.* **26**: 379-407.

Weller, D.M., Cook, R.J. (1986) Increased growth of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads, and implications of *Pythium* control. *Can. J. Plant Pathol.* **8**: 328-334.

Werner, D. (1992) „Symbiosis of plants and microbes“. Chapman and Hall, London, New York.

Whipps, J.M. McQuilken, M.P. (1993) Aspects of biocontrol of fungal plant pathogens. In Jones, D.G. (Ed.) „Exploitation of Microorganisms“, S. 45-79, Chapman and Hall, London.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.) „PCR Protocols. a guide to methods and applications“, S. 315-322, Academic Press, New York, London.

Wilkinson, H.T., Weller, D.M., Allredge, J.R. (1982) Enhanced biological control of wheat take-all when inhibitory *Pseudomonas* strains are introduced on inoculum or seed as opposed to directly into soil. *Phytopathology* **72**: 948-949.

Wölk, M. (1990) Möglichkeiten des Einsatzes von Bakterien gegenüber *Rhizoctonia solani* und *Pythium aphanidermatum*. Dissertation, Universität Hohenheim.

Yuen, G.Y., Henderson, M., Rella, M., Schroth, M.N. (1987) The roles of iron competition and antibiosis in the inhibition of *Pythium ultimum* by *Pseudomonas fluorescens* biovar IV. *J. Phytopathol.* **77**: 1758.

Zhou, T., Paulitz, T.C. (1993) *In vitro* and *in vivo* effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum*: zoospore behaviour in exudates and in the rhizosphere of bacteria-treated cucumber roots. *Phytopathology* **83**: 872-876:

7 Anhang

Definition der verwendeten Abkürzungen

cfu	colony forming units
DAD	Dioden-Array-Detektor
FG	Frischgewicht
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
lx	lux
OD	Optische Dichte
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	rotations per minute
SIM	Similarity Index des BIOLOG-Systems
TG	Trockengewicht
UV	Ultraviolett
ÜN-Kultur	Übernacht-Kultur
WK _{max}	maximale Wasserkapazität

Publikationen und Tagungsbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden / werden veröffentlicht als:

- **Schulz, U. M., Werner, D.** (1998): Enhancement of the antagonistic potential of *Pseudomonas fluorescens* towards *Pythium ultimum* on cucumber (*Cucumis sativus* L.) by flavonoids. *J. Plant Diseases and Protection* **105** (2), 157-167.
- **Batinic, T., Schmitt, J., Schulz, U. M., Werner, D.** (1998): Construction of RAPD-generated DNA probes for the quantification of *Bacillus subtilis* FZB C and the evaluation of its biocontrol efficiency in the system *Cucumis sativus* - *Pythium ultimum*. *J. Plant Diseases and Protection* **105** (2), 168-180.
- **Redecker, D., Batinic, T., Feder, I. S., Kosch, K., Schulz, U. M., Vinuesa-Fleischmann, P., Werner, D.** (in Vorb.): Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* W34: specific detection and quantification in the rhizosphere of *Cucumis sativus* with a DNA probe and characterization by DNA fingerprinting.

Tagungsbeiträge:

- „Development of a plant test system for quantifying the antagonistic potential of different isolates of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* towards *Pythium* sp.“. 48th International Symposium on Crop Protection, Gent, Belgien, 1996.
- „Quantifizierung des antagonistischen Potentials verschiedener *Pseudomonas fluorescens*-Stämme gegenüber *Pythium ultimum*“. 50. Deutsche Pflanzenschutztagung, Münster 1996.

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 24. 07. 1998

Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Werner danke ich sehr herzlich für die vielseitige und großzügige Unterstützung während des Entstehens dieser Arbeit, außerdem für den mir gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas, für die Unterstützung meiner Teilnahme an Tagungen und das Vertrauen bei der Überlassung der Verantwortung für Beschaffung und Inbetriebnahme des Fermenters.

Das Korreferat wurde von Herrn Prof. Dr. H. Senger übernommen, wofür ich ihm herzlich danke.

Bei den folgenden Wissenschaftlern, die mir die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen zur Verfügung gestellt haben, mir mit Tips oder in Form von Zusammenarbeit geholfen haben, möchte ich mich an dieser Stelle bedanken: Herrn Prof. Dr. H. Buchenauer (Universität Hohenheim), Herrn Prof. Dr. H. Bochow (Humboldt-Universität Berlin), Herrn Dr. J. Cooper (University of Belfast, Northern Ireland), Frau Dr. R. Grosch (Inst. für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren), Herrn Dr. E. Koch (BBA Darmstadt), Herrn Prof. Dr. E. Wollenweber (Universität Darmstadt).

Herrn Dr. A. Schaper danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder.

Für die Überlassung des Sputtergerätes und der Dunkelkammer danke ich der Arbeitsgruppe Kost.

Meiner Diplomandin Johanna Schmitt danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Mithilfe bei diesem Projekt.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das gute und freundliche Arbeitsklima, vor allem aber Helen Steele und Cristina Bolaños für die konstruktiven Diskussionen und die Zusammenarbeit bei der Exsudat-Analysen und meinen Laborkolleginnen Heike Neumann, Johanna Schmitt, Anne Bode-Kirchhoff und Stefanie Böckenhoff für die Unterstützung bei den Routinearbeiten im Rahmen der Gewächshausgroßversuche. Lucette Claudet danke ich herzlich für ihr stetes Engagement, das oft weit über die fachliche Seite hinausging, und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft bei verwaltungstechnischen Dingen.

Allen Institutsangehörigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere den Mitarbeitern der Werkstatt, des Botanischen Gartens und der Bibliothek, danke ich ebenfalls.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Biologischer Pflanzenschutz gegen bodenbürtige Phytopathogene“ durchgeführt und durch den Projektträger Biologie, Ökologie und Energie (BEO, Jülich) finanziell unterstützt.